Aus der kieferchirurgischen Klinik im Universitätsklinikum Steglitz

(Leiter: Prof. Dr. Dr. Rudolf Stellmach)

# DIE WIRKUNG VON BLEOMYCIN, METHOTREXAT UND VINCRISTIN AUF DAS YOSHIDA-SARKOM DER MAUS

Dissertation

zur

Erlangung der zahnmedizinischen Doktorwürde

am Fachbereich Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde

der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Zahnärztin Marga Adler, geb. Duchardt

aus Bad Nauheim

1978

Aus der kieferchirurgischen Klinik im Universitätsklinikum Steglitz

(Leiter: Prof. Dr. Dr. Rudolf Stellmach)

# DIE WIRKUNG VON BLEOMYCIN, METHOTREXAT UND VINCRISTIN AUF DAS YOSHIDA-SARKOM DER MAUS

Dissertation

zur

Erlangung der zahnmedizinischen Doktorwürde

am Fachbereich Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde

der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Zahnärztin Marga Adler, geb. Duchardt

aus Bad Nauheim

Referent: Priv.-Doz. Dr. Dr. Klaus Bitter

Korreferent: Prof. Dr. Hans-Jörg Kirstaedter

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde der Freien Universität Berlin

Promoviert am: 28.11.1978

UNIV. LEIDEN BIBL.

Meinen Eltern

in Liebe und Dankbarkeit!

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41544728_0018

# DIE WIRKUNG VON BLEOMYCIN, METHOTREXAT UND VINCRISTIN AUF DAS YOSHIDA-SARKOM DER MAUS

## Einleitung

Bleomycin, Methotrexat und Vincristin sind Zytostatika, die zur Behandlung des Plattenepithelkarzinoms verwendet werden.
Bleomycin ist ein Zytostatikum aus der Gruppe der Antibiotika. Es hat eine hemmende Wirkung auf die DNS-Synthese und zerstört vermutlich das DNS-Molekül.
Methotrexat ist ein Folsäureantagonist. Es hemmt kompetitiv das Enzym Folsäurereduktase und damit die Thymidylat-Synthese.
Vincristin ist ein Alkaloid, das die Zellteilung in der Metaphase hemmt.

Zytostatika haben keine spezifische Wirkung gegen Tumorzellen, es werden auch normale Zellen angegriffen. Warum Tumorzellen empfindlicher gegen manche Substanzen reagieren, ist bisher ungeklärt. Früher glaubte man, dieses beruhe auf einer höheren Teilungsfrequenz der Karzinomzellen. Die sogenannten Mausergewebe (blutbildendes Knochenmark, Darmepithelien etc.) haben jedoch einen wesentlich schnelleren Teilungsrhythmus als die am schnellsten wachsenden Geschwülste. Diese Zellsysteme sind daher für die Dosierung der Zytostatika sehr bedeutend. Der Unterschied der Empfindlichkeit der Krebszellen und der gesunden Gewebe gegen ein Zytostatikum wird als "therapeutische Breite" bezeichnet. Sie ist gewöhnlich sehr klein.
Um sie zu steigern, hat Biermann 1952 erstmals das Prinzip der regionalen intraarteriellen Zytostatika-Perfusion des tumortragenden Gewebes entwickelt. Er erhoffte sich dabei eine Erhöhung der Wirkstoffkonzentration im perfundierten Tumor und eine Erniedrigung der zur Wirkung nötigen Gesamtdosis (siehe Abb. 1). So einleuchtend dieses Verfahren auf den ersten Blick erscheint, so schwierig wird es, wenn man die kinetischen Parameter der verwendeten Medikamente zu berücksichtigen versucht. Diese sind:

1) Geschwindigkeit des Einstroms von der Blutbahn in die Tumorzelle,
2) Geschwindigkeit des Rückstroms von der Zelle in die Blutbahn
3) Mindesteinwirkdauer des Zytostatikums auf die Tumorzellen, um eine letale Schädigung zu bewirken,
4) Konzentration des Zytostatikums in der Tumorzelle.

Zu 1) Abb. 2 zeigt eine schematische Darstellung der Perfusionssituation. Aus der Spitze eines Katheters, der in die arterielle Blutbahn eingeführt ist, tritt ein Medikament aus, das durch Weitertransport über die Kapillaren und Venen in den Gesamtkreislauf gelangt. Durch dauernde Perfusion erhält man im intravasalen Raum des perfundierten Areals eine langsam steigende Wirkstoffkonzentration. Vom intravasalen Gebiet diffundiert der Wirkstoff über den extrazellulären in den intrazellulären Raum.
Die erste wichtige Größe ist die Geschwindigkeit des Konzentrationsausgleichs zwischen intravasal und intrazellulär. Auf Abb. 3 können wir diese Situation sehen. Es muß also zunächst die Zeit bestimmt werden, die zwischen den Situationen von der Abb. 2 und der Abb. 3 verstreicht. Im Falle einer langsamen Geschwindigkeit muß lange perfundiert werden, um eine ausreichende Konzentration in der Tumorzelle zu erreichen. Das heißt, daß eine große Menge Zytostatikum in den Gesamtorganismus überläuft. Bei einer hohen Geschwindigkeit kommt es nach kurzer Perfusion zu einem Ausgleich. Der Überlauf wird sehr gering.

Zu 2) Abb. 4 stellt den Rückstrom des Zytostatikums aus der Zelle in die Blutbahn nach beendeter Perfusion dar. Die zweite wichtige Größe ist die Geschwindigkeit dieses Rückstroms. Im allgemeinen verläuft der Rückstrom langsamer als der Einstrom. Angenommen, man beobachtet einen schnellen Einstrom des Zytostatikums in die Zelle und einen schnellen Rückstrom aus der Zelle, so kann es möglich sein, daß der Kontakt des Zytostatikums mit der Zelle zu kurz war, um sie letal zu schädigen. Um in diesem Fall eine letale Wirkung

zu erreichen, muß länger perfundiert werden, was wiederum auf Kosten des Gesamtorganismus geht und was sich sogar den Verhältnissen einer intravenösen Applikation nähert, bzw. mit ihr identisch wird. Dann wäre natürlich eine intraarterielle Perfusion nicht mehr gerechtfertigt.

Zu 3) Als dritte wichtige Größe ist folglich die Mindesteinwirkdauer des Zytostatikums auf die Tumorzellen zu nennen, die lange genug sein muß, um eine letale Schädigung zu bewirken.

Zu 4) Die vierte wichtige Größe ist die Konzentration des Zytostatikums. Bei einer zu geringen Konzentration kann keine ausreichend letale Schädigung eintreten. Auch eine länger dauernde Perfusion würde daran nichts ändern. Bei einer hohen Konzentration werden die Tumorzellen letal geschädigt, da es auch entsprechend schnell zum Konzentrationsausgleich zwischen intravasal und intrazellulär kommt. Aber bei sehr bzw. zu hohen Dosen wird wiederum der Gesamtorganismus mit toxischen Nebenwirkungen belastet.

Aus dem obigen ist zu ersehen, daß es notwendig ist, für jedes Zytostatikum möglichst alle kinetischen Informationen zu kennen, um es optimal anwenden zu können.

In der vorliegenden Arbeit werden die Ergebnisse von Experimenten an Yoshida-Sarkomzellen mitgeteilt. Dieses Tumormodell wurde herangezogen, um letale Schädigung durch Bleomycin, Methotrexat und Vincristin in Abhängigkeit von der Konzentration und Einwirkungszeit zu bestimmen.

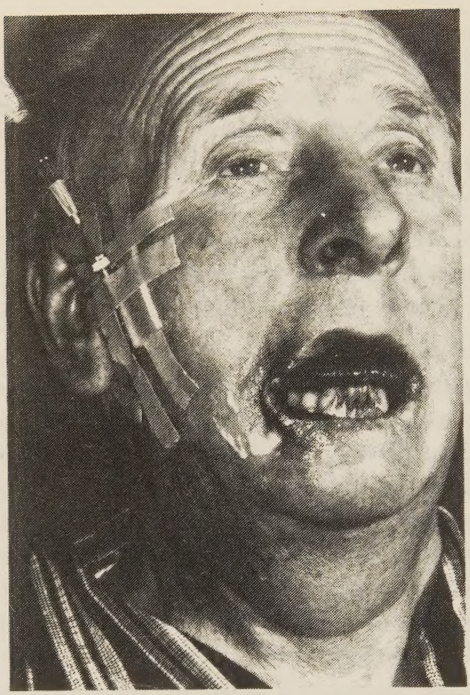


Abb. 1:

Regionale intraarterielle Perfusion des gesamten Gefäßbaumes der A. carotis externa mit allen Ästen. Als Farbstoff wurde Patent-Blau verwendet, der sich im durchströmten Areal verteilt.

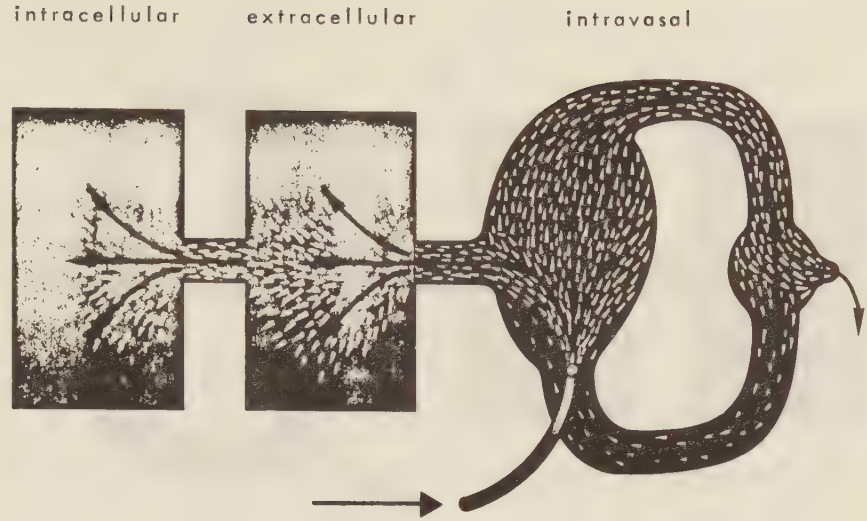



Abb. 2:

Schematische Darstellung der Perfusionssituation. Der Katheter ist in die arterielle Blutbahn eingeführt. Das Medikament gelangt in den Gesamtkreislauf und diffundiert über den extrazellulären in den intrazellulären Raum.

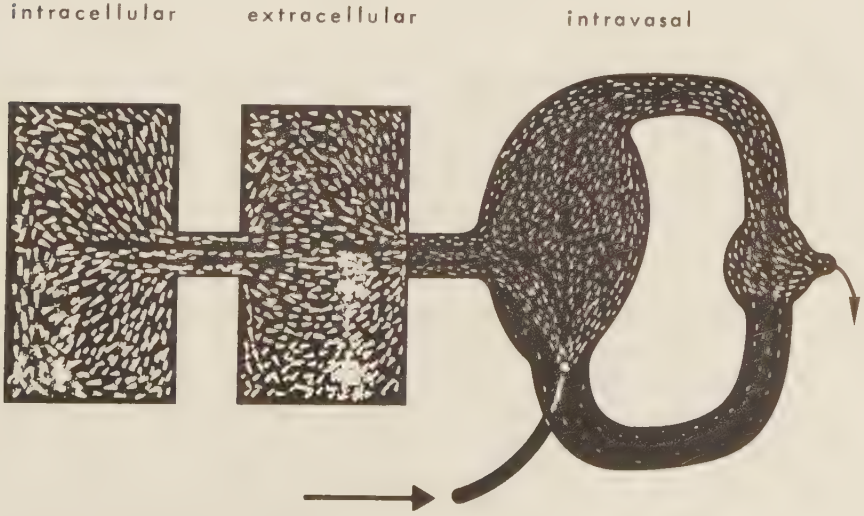



Abb. 3:

Hier ist ein Konzentrationsausgleich bei andauernder Perfusion zwischen intravasal und intrazellulär erreicht.

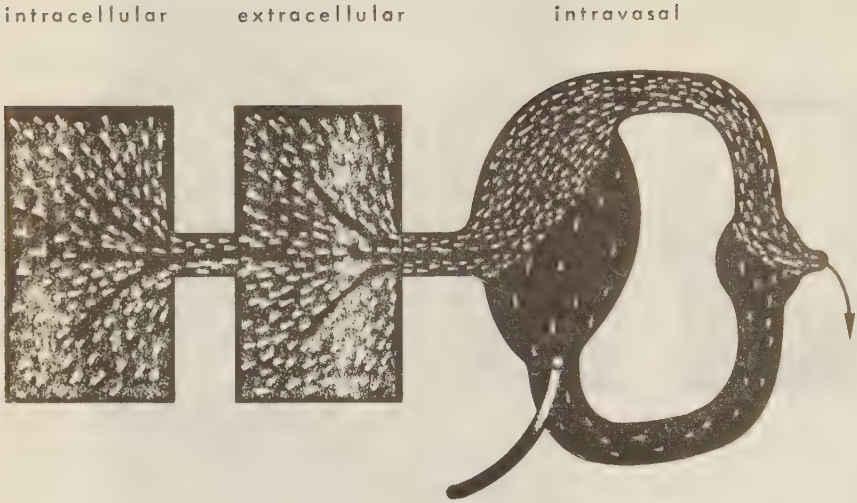



Abb. 4:

Rückstrom des Medikaments aus der Zelle in die Blutbahn nach beendeter Perfusion.

Material und Methode

I) Die Versuche werden mit dem Yóshida-Sarkom durchgeführt. 0,2 ml genuiner Tumor werden zur Aufrechterhaltung wöchentlich intraperitonal auf weibliche Mäuse des Stamms $CF_1$ (Winkelmann/Paderborn) überimpft. Die Mäuse haben ein Gewicht von circa 30 g und wachsen unter konventioneller Haltung, das heißt, sie bekommen Wasser und Standarddiät (Altromin) ad libitum.

Für die Versuche wird der Tumor am fünften Tag nach der Inokulation verwendet.

Wirkstoffe:
a) Bleomycinum Mack (Mack/Illertissen), Abb. 5 und 6
b) Methotrexat "Lederle" (Lederle/München), Abb. 7
c) Vincristin, Lilly (Lilly/Bad Homburg), Abb. 8

Kulturmedien:
a) Eagle's Minimal Essential Medium (MEM) mit 8,4 % $NaHCO_3$ und foetalem Kälberserum (Bio-Cult/Paisley, Renfrewshire, Scotland)
b) Hank's Balanced Salt Solutions (BBS) (Bio-Cult/Paisley)

Apparate:

Die Durchführung der Versuche geschieht mit sterilisierten Arbeitsgeräten und unter aseptischen Bedingungen. Das Arbeiten erfolgt im laminaren Luftstrom.

a) Puro-Bank Typ PBG/H10/6 (Meissner und Wurst/Stuttgart)
b) Begasungsbrutschrank KB600K/$CO_2$ (Heraeus/Hanau)
c) Zentrifuge: Ecco-Superior-IVB
d) Medap-Pumpe (5 atü)
e) Rührkulturbank für 20 Ansätze bestehend aus einem Thermostatwasserbad (37° C) mit Pumpe und Rührmotor. In diese werden Glaskulturgefäße (25 ml) mit Rührstab und zwei Ansatzstutzen eingehängt. Begasung erfolgt mit einem Luftgasgemisch von 95 % Luft und 5 % $CO_2$.
f) Mikroskop: Diavert (Leitz/Wetzlar)
g) Zählkammer: Neubauer

II) Je Versuch wird eine Suspension in Medium mit 2,5 x $10^6$ Tumorzellen/ml hergestellt. 20 Ansätze mit je zwei ml werden in Petrischalen verteilt, und 10µl der Wirkstofflösung zugesetzt. Endkonzentrationen sind folgende:
Bleomycin: 1 000 µg/ml, 100 µg/ml, 50 µg/ml oder 10 µg/ml
Methotrexat: $10^{-8}$M/l, $10^{-7}$M/l oder $10^{-6}$M/l
Vincristin: 1 µg/ml, 0,1 µg/ml, 0,01 µg/ml oder 0,001 µg/ml.
Die Inkubation erfolgt im Brutschrank bei 37° C und bei $CO_2$-Luftbegsaung ($CO_2$ 5 %/Luft 95 %) für die Zeiten von: 10 min, 30 min, 1h, 2h, 3h, 4h oder 6h.
Anschließend werden die Ansätze zweimal mit Hankscher Lösung gewaschen, das heißt, sie werden mit Hankscher Lösung aufgefüllt, zentrifugiert und der Überstand wird abgesaugt. Danach werden die Ansätze mit Medium auf 1 ml bzw. 3 ml Volumen aufgefüllt und resuspendiert. Diese Zellsuspension wird zu 20 ml Medium in Rührkulturgefäße gegeben (1,25 x $10^5$ Zellen bzw. 2,5 x $10^5$ Zellen pro Ansatz) und das Wachstum über vier bzw. sieben Tage beobachtet.
Die Zellzahl wird zu Beginn des Versuchs und in Abständen von 24 Stunden bestimmt.

| | |
|---|---|
| Bleomycin $A_2$: | 55 – 70 % |
| Bleomycin $A'_2$: | nicht über 7 % |
| Bleomycin $B_2$: | 25 – 32 % |
| Bleomycin $B_4$: | nicht über 1 % |
| Summe der B-Gruppe: | nicht über 35 % |

Chemie

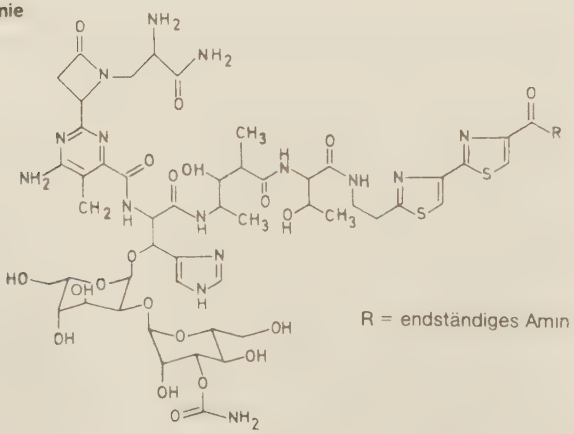
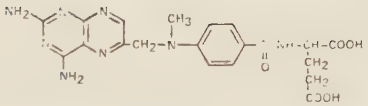



Abb. 5

| Bleomycin | Endständiges Amin |
|---|---|
| $A_1$ | $-NH-(CH_2)_3-SO-CH_3$ |
| Desmethyl-$A_2$ | $-NH-(CH_2)_3-S-CH_3$ |
| $A_2$ | $-NH-(CH_2)_3-S^+(CH_3)_2$ |
| $A_2$-a | $-NH-(CH_2)_4-NH_2$ |
| $A_2$-b | $-NH-(CH_2)_3-NH_2$ |
| $A_2$-c | $-NH-(CH_2)_2$-(Imidazolium-H) |
| $A_5$ | $-NH-(CH_2)_3-NH-(CH_2)_4-NH_2$ |
| $A_6$ | $-NH-(CH_2)_3-NH-(CH_2)_4-NH-(CH_2)_3-NH_2$ |
| $B_1$ | $-NH_2$ |
| $B_2$ | $-NH-(CH_2)_4-NH-C(=NH)-NH_2$ |
| $B_4$ | $-NH-(CH_2)_4-NH-C(=NH)-NH-(CH_2)_4-NH-C(=NH)-NH_2$ |

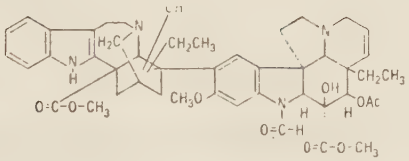
Abb. 6



METHOTREXATE

Abb. 7

VINCRISTINE



R=$CH_3$ (Vinblastine)

Abb. 8

Ergebnisse

Versuch 1 (Abb. 9 a und Abb. 9 b)

In diesem Versuch wurde die Wirkung von 10 µg/ml, 100 µg/ml und 1 000 µg/ml Bleomycin bei einer Einwirkungszeit von 30 min untersucht. Es wurden je Konzentration fünf Ansätze hergestellt, außerdem fünf Kontrollen ohne Wirkstoff.
Aus der Kurve 9 a ist zu ersehen, daß sich die Zellzahl der Kontrollkulturen bis zum 4. Tag vervierfacht, die Zellenzahl bei 10 µg/ml sich verdoppelt, bei 100 µg/ml sinkt sie etwa um die Hälfte.

Die Kurve 9 b zeigt ebenfalls die Dosiswirkung in bezug auf das Wachstum. Deutlich ist ein Knick in der Kurve bei 100 µg/ml Bleomycin und 33 % Wachstum zu erkennen. Bei 10 µg/ml wurde das Wachstum bereits auf 57 % gesenkt. Nach dem Knick sinkt das Wachstum nur langsam ab, bei 1 000 µg/ml sind es 27 %.

Versuch 2 (Abb. 10 a und Abb. 10 b)

Der zweite Versuch wurde mit den gleichen Bleomycinkonzentrationen und der gleichen Einwirkungszeit ausgeführt wie der erste.
Die Kurve 10 a zeigt, daß die Zellzahl der Kontrollkulturen bis zum 6. Tag auf das Vierfache ansteigt, die Zellzahl mit 10 µg/ml Bleomycin steigt auf mehr als das Fünffache. Beide Werte sinken am 7. Tag deutlich ab. Dies deutet darauf hin, daß die Nährstoffe im Medium für die große Zellzahl nicht mehr ausreichend waren, obwohl die Zellen am 3. Tag in frisches Medium gesetzt wurden. Die Werte mit 100 µg/ml steigen etwa um 1/3 an, während die 1 000 µg/ml-Werte um knapp die Hälfte absinken.
Bei der Kurve 10 b fällt wieder deutlich der Knick bei 100 µg/ml und 53 % Wachstum auf. Bis zu diesem Punkt fällt die Kurve steil und danach zum 1 000 µg/ml-Wert langsamer auf 28 % Wachstum ab. Der 10 µg/ml-Wert wurde hierbei außer acht gelassen, da er mehr als die Kontrollen wuchs und aus der Reihe fällt.

Abb. 9a

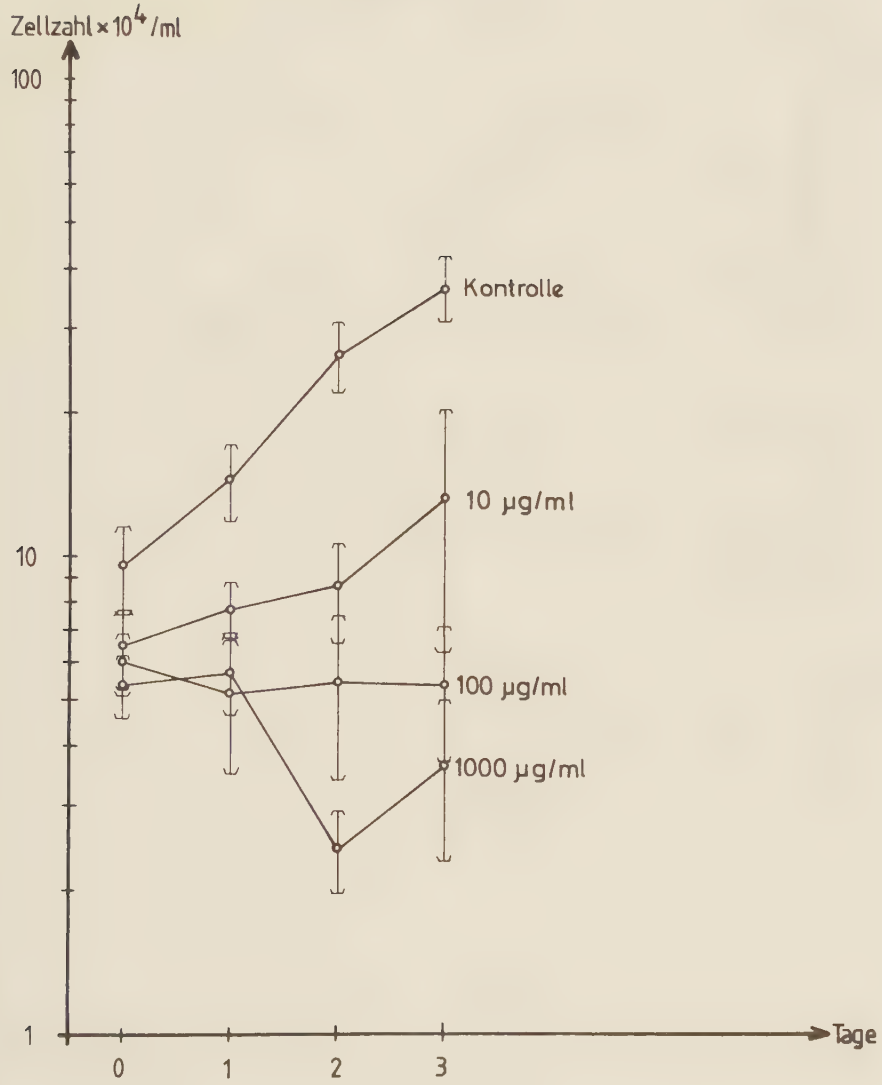



Abb. 9 a:

Wachstum des Yoshida-Sarkoms in vitro unter dem Einfluß verschiedener Bleomycin-Konzentrationen. Jeder Wert stellt das Mittel aus fünf verschiedenen Ansätzen dar (100 µg/ml und Kontrollen je vier Ansätze).

Abb. 9 b

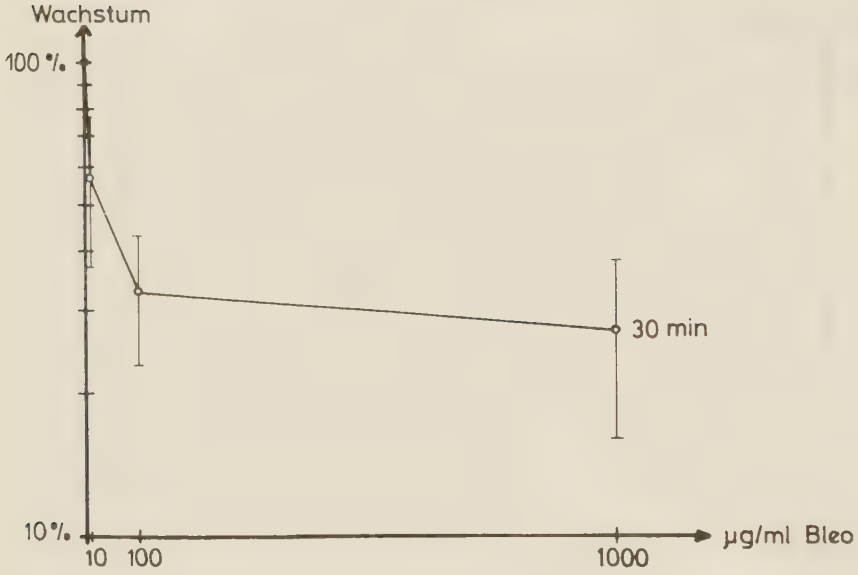



Abb. 9 b:

Ergebnis des Versuchs der Abb. 9 a, dargestellt als prozentuales Wachstum in Abhängigkeit von der Bleomycin-Konzentration.

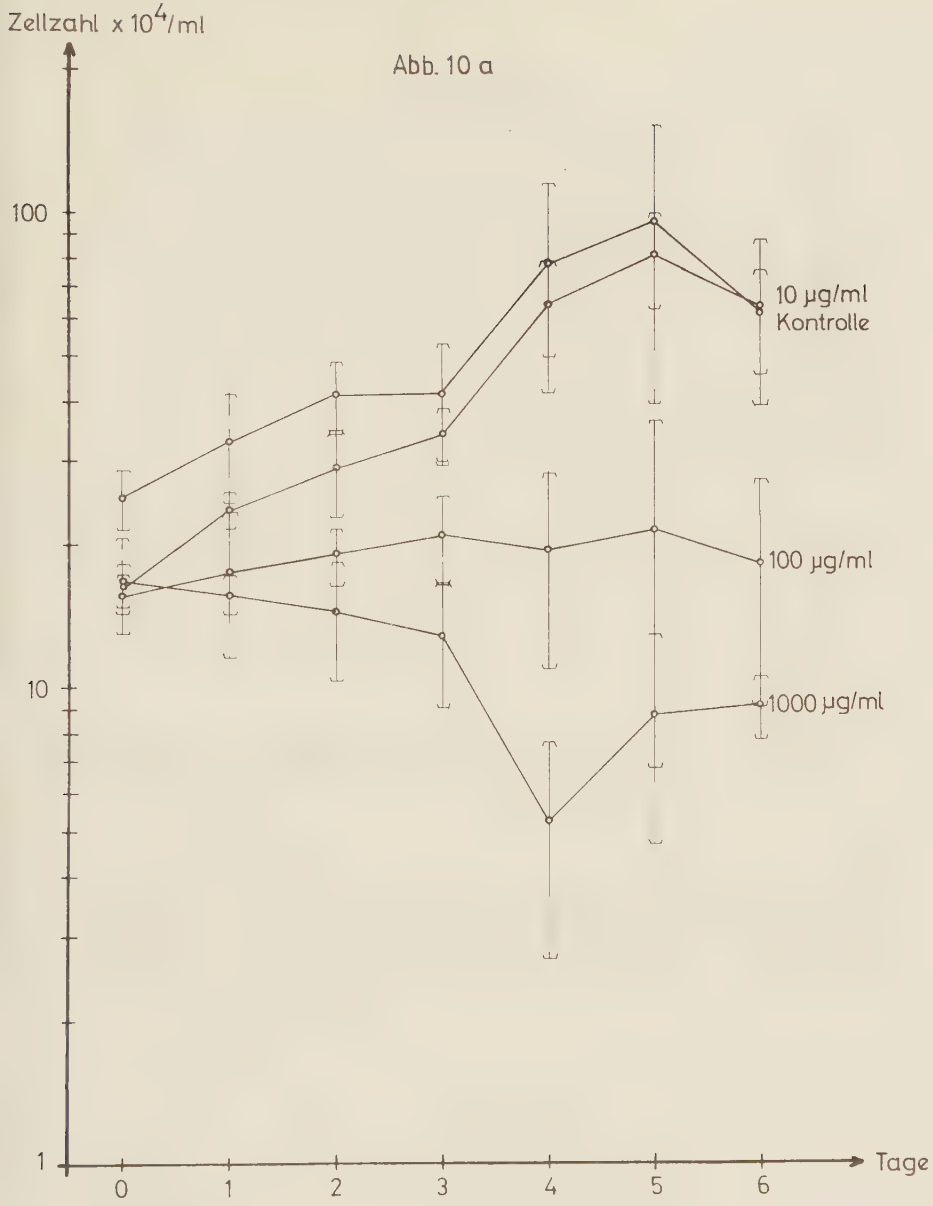



Abb. 10 a:

Wachstum des Yoshida-Sarkoms in vitro unter dem Einfluß verschiedener Bleomycin-Konzentrationen. Jeder Wert stellt das Mittel aus fünf verschiedenen Ansätzen dar (Kontrollen vier Ansätze).

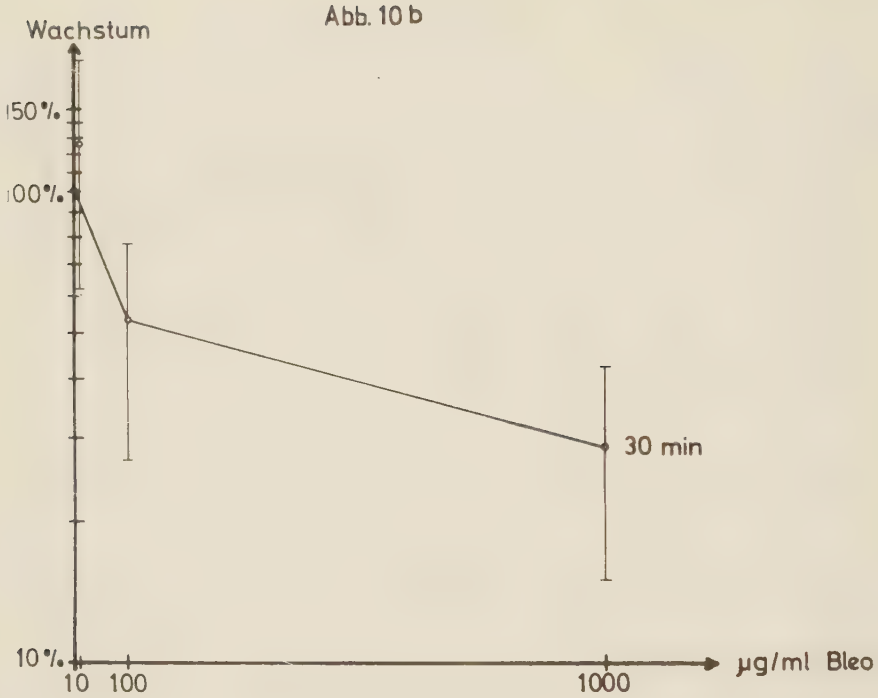



Abb. 10 b:

Ergebnis des Versuchs der Abb. 10 a, dargestellt als prozentuales Wachstum in Abhängigkeit von der Bleomycin-Konzentration.

Versuch 3 (Abb. 11 a und Abb. 11 b)

Dieser Versuch wurde mit den gleichen Dosen wie Versuch 1 und 2 durchgeführt.
Aus der Kurve 11 a kann man sehen, daß die Zellzahl der Kontrollen sich am 7. Tag um eine Zehnerpotenz vermehrt hat. Die 10 µg/ml-Werte erhöhten sich um das Fünffache, die 100 µg/ml-Werte stiegen um etwa die Hälfte. Die 1 000 µg/ml-Werte sanken fast um eine Zehnerpotenz.
Am 4. Tag ist jede der vier Kurven unterbrochen und zeigt zwei Werte. Das kam dadurch zustande, daß am 4. Tag die Zellen in frisches Medium gesetzt wurden, und die Zellzahl direkt vor und nach dem Umsetzen bestimmt wurde.
In der Kurve 11 b ist wieder ein Knick bei circa 30 % Wachstum zu erkennen. Hier fällt die Kurve nach diesem Knick etwas steiler als in den vorangegangenen Kurven ab. Das Wachstum für 10 µg/ml liegt bei 64 %, für 100 µg/ml bei 29,5 % und für 1 000 µg/ml bei 9,9 % im Vergleich zu den Kontrollen.

Versuch 4 (Abb. 12 a und Abb. 12 b)

Der 4. Versuch wurde mit den Bleomycin-Konzentrationen 10 µg/ml, 50 µg/ml und 100 µg/ml bei einer Einwirkungszeit von 30 min durchgeführt.
Aus der Kurve 12 a erkennt man, daß sich in diesem Versuch alle Zellen stark vermehrten. Die Zellzahl der Kontrollen stieg um das Siebenfache, die 10 µg/ml-Werte um das Sechsfache, die 50 µg/ml-Werte um das Fünffache und die 100 µg/ml-Werte um das Vierfache.

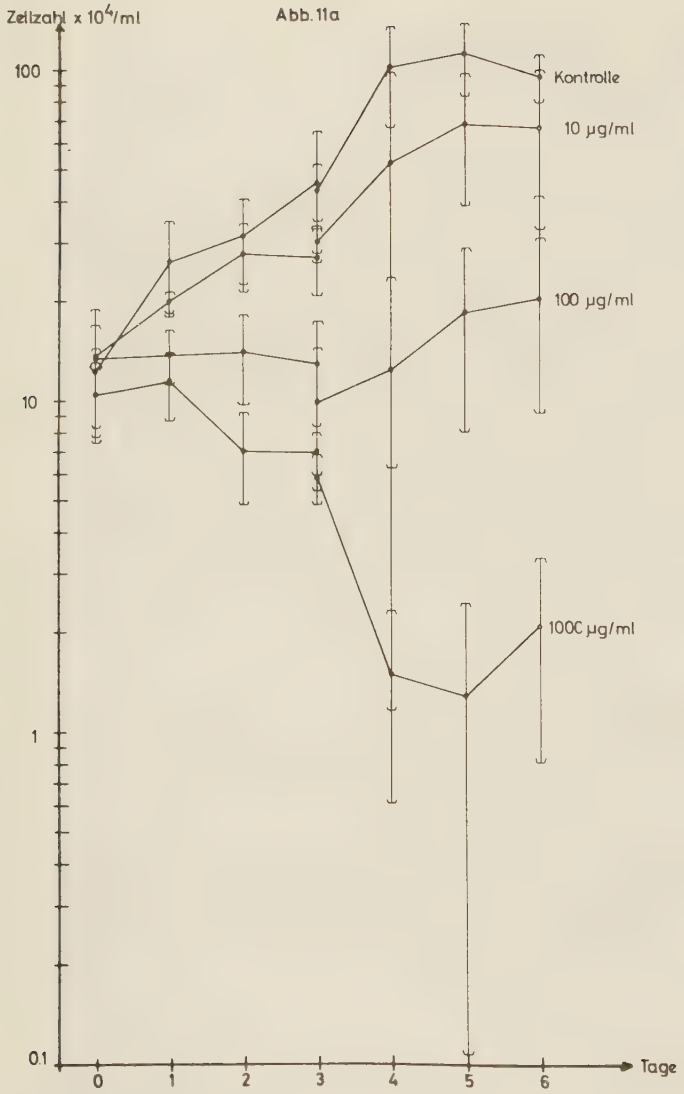



Abb. 11 a:

Wachstum des Yoshida-Sarkoms in vitro unter dem Einfluß verschiedener Bleomycin-Konzentrationen. Jeder Wert stellt das Mittel aus fünf verschiedenen Ansätzen dar (10 µg/ml vier Ansätze). Nach drei Tagen Wachstum werden die Zellzahlen direkt vor und nach dem Umsetzen der Zellen in frisches Medium bestimmt.

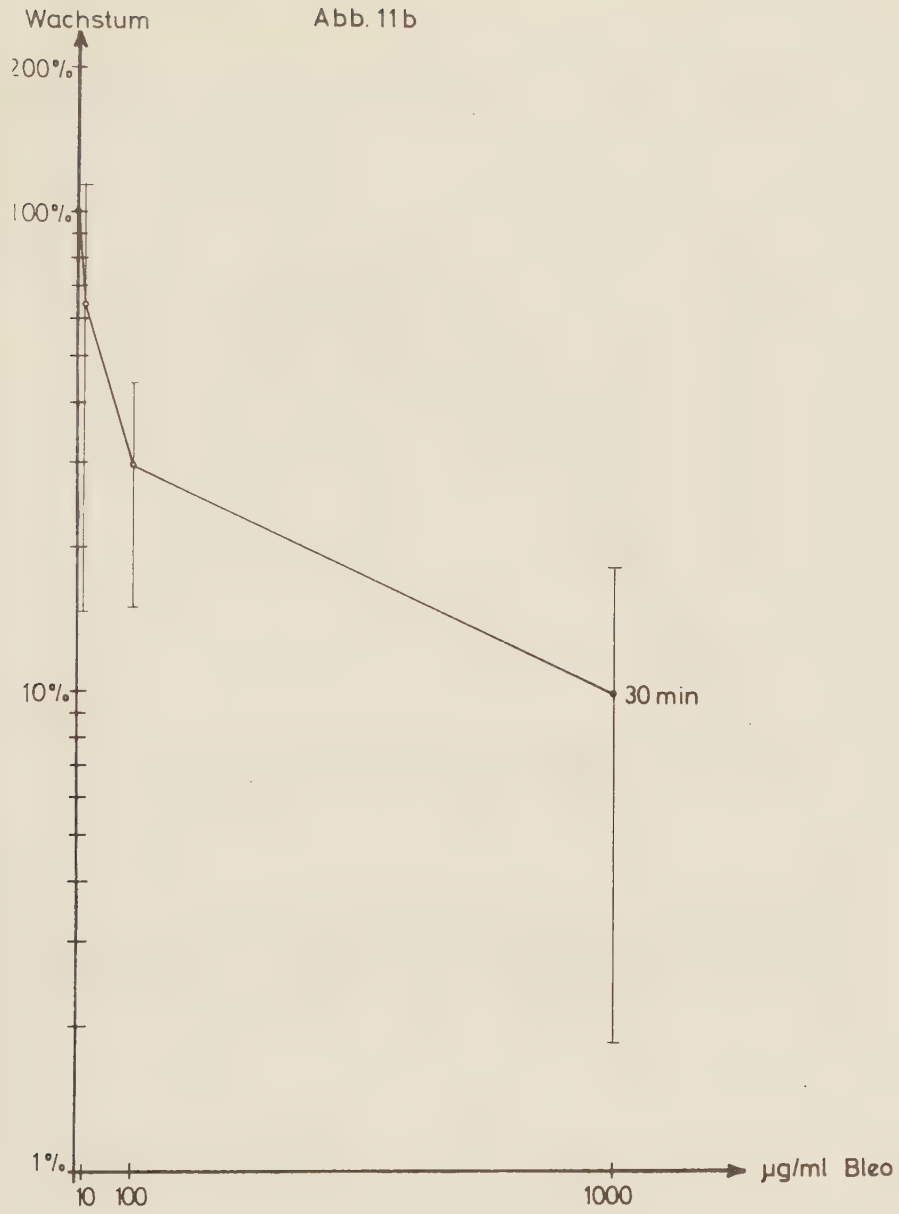



Abb. 11 b:

Ergebnis des Versuchs der Abb. 11 a, dargestellt als prozentuales Wachstum in Abhängigkeit von der Bleomycin-Konzentration.

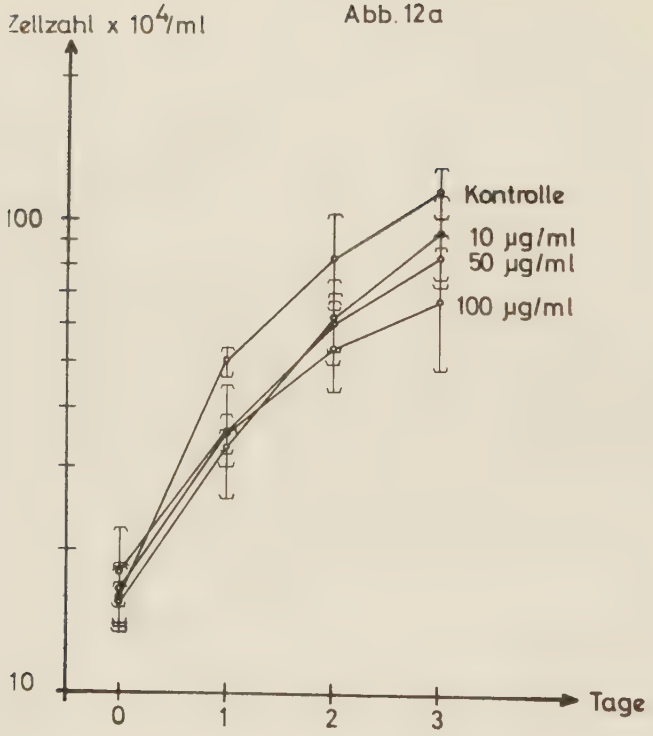



Abb. 12 a:

Wachstum des Yoshida-Sarkoms in vitro unter dem Einfluß verschiedener Bleomycin-Konzentrationen. Jeder Wert stellt das Mittel aus fünf verschiedenen Ansätzen dar (100 µg/ml vier Ansätze).

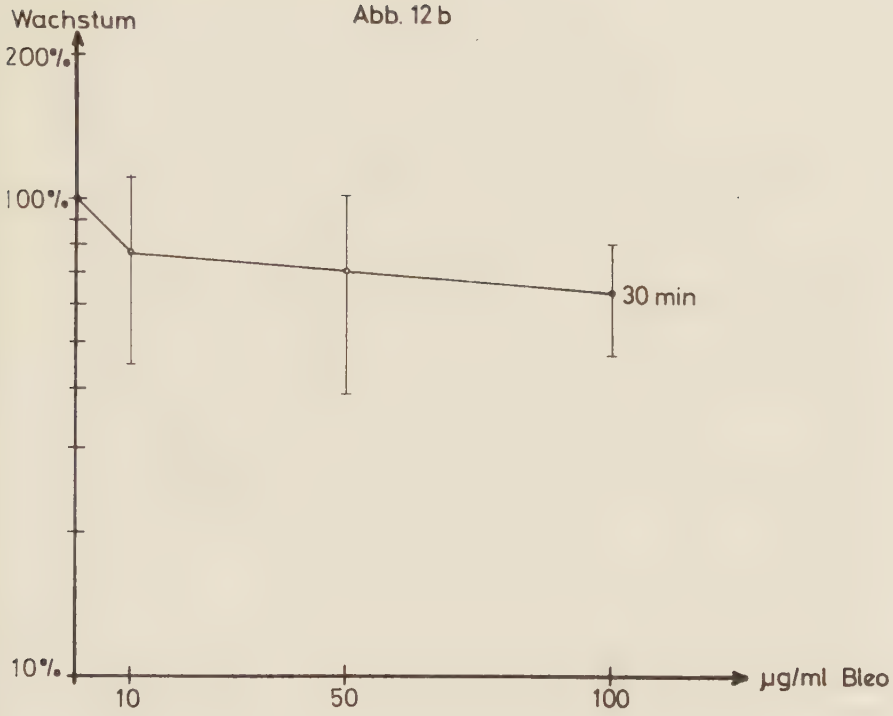



Abb. 12 b:

Ergebnis des Versuchs der Abb. 12 a, dargestellt als prozentuales Wachstum in Abhängigkeit von der Bleomycin-Konzentration.

Versuch 5 (Abb. 13 a und Abb. 13 b)

Hier wurde ein Zeit-Wirkungsversuch mit zwei verschiedenen Bleomycin-Dosen durchgeführt, und zwar mit 10 µg/ml und mit 100 µg/ml. Die Einwirkungszeiten betrugen 10, 30, 60 und 120 min. Es wurden jeweils zwei Rührkulturen für jeden Wert hergestellt, außer für die beiden 30-min-Werte, für die nur jeweils eine Kultur hergestellt wurde.
In der Kurve 13 a erkennt man sehr gut das exponentielle Wachstum der Kontrollen. Ihre Zellzahl stieg um etwa das Siebenfache. Bei den 100 µg/ml-Werten verringerten sich die 120-min-Werte um 2/3, die 60-min-Werte verringerten sich minimal, der 30-min-Wert stieg um das Dreifache (dieser Wert liegt zu hoch) und die 10-min-Werte stiegen um die Hälfte.

Bei den 10 µg/ml-Werten verringerte sich das Wachstum bei einer Einwirkungszeit von 120 min um fast die Hälfte. Bei einer Zeit von 60 min stieg das Wachstum um das Zweifache, bei 30 min sank es gering (dieser Wert liegt zu niedrig), und bei 10 min stieg es um das 3,5-fache.
Die Abbildung 13 b zeigt zwei Kurven, für 10 µg/ml und für 100 µg/ml Bleomycin. In beiden ist wieder deutlich ein Knick zu erkennen, der für beide Kurven bei 10 min liegt. Für 10 µg/ml liegt dieser Wert bei 69 % und für 100 µg/ml bei 39 %. Die 30-min-Werte wurden für beide Kurven hierbei nicht berücksichtigt, da sie sehr stark von den Kurven abweichen. Für 10 µg/ml liegt der 60-min-Wert bei 42 % und der 120-min-Wert bei 20 %. Für 100 µg/ml liegt der 60-min-Wert bei 19 % und der 120-min-Wert bei 14 %.
Die beiden Kurven verlaufen nach dem Knick fast parallel. Man erkennt, daß der Dosisunterschied sich in den ersten 10 min deutlich bemerkbar macht.

Abb. 13a

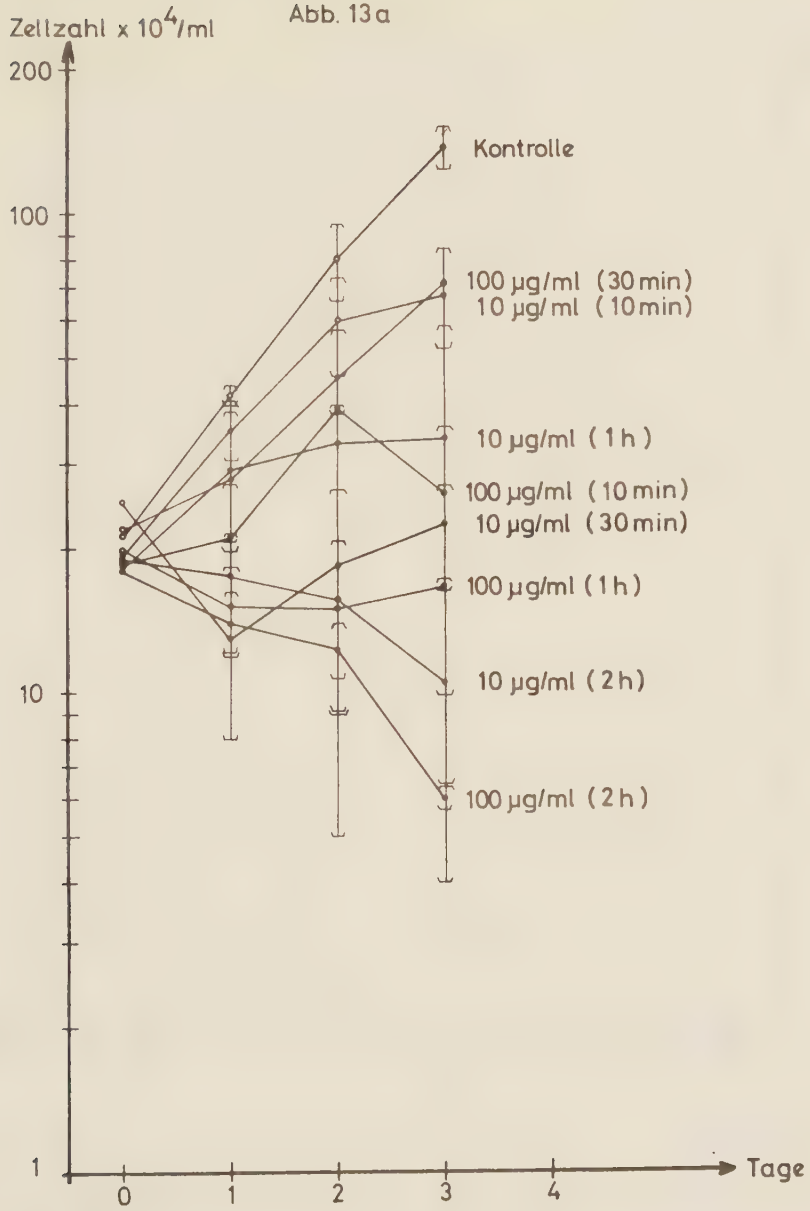



Abb. 13 a:

Wachstum des Yoshida-Sarkoms in vitro unter dem Einfluß zweier Bleomycin-Konzentrationen bei verschiedenen Einwirkungszeiten. Jeder Wert stellt das Mittel aus zwei verschiedenen Ansätzen dar (30 min je einen Wert).

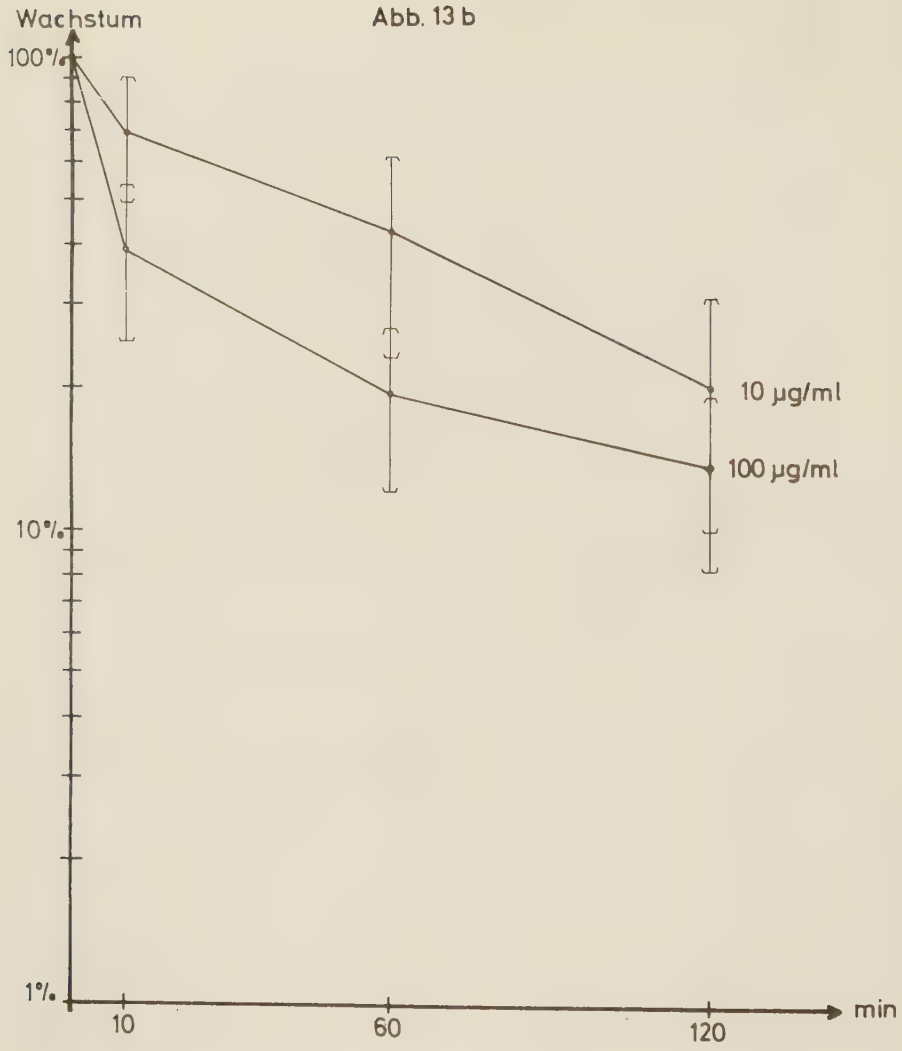



Abb. 13 b:

Ergebnis des Versuchs der Abb. 13 a, dargestellt als prozentuales Wachstum in Abhängigkeit von der Einwirkungszeit.

Versuch 6 (Abb. 14 a und Abb. 14 b)

In diesem Versuch wirkte eine 10 µg/ml Bleomycin-Dosis 10 min, 1h, 2h und 3h auf die Tumorzellen ein.
In der Kurve 14 a wachsen die Kontrollen am schnellsten, ihre Zellzahl vermehrt sich um das 3,5-fache. Die 10-min-Werte vergrößern sich um das Dreifache, die 1h-Werte um das knapp Zweifache, die 2h-Werte um das Zweifache und die 3h-Werte um das 1 1/2-fache.
Die Kurve 14 b zeigt die Hemmung des Wachstums, das bei einer Einwirkungszeit von 10 min auf 82 % sinkt, bei 60 min auf 60 %, bei 120 min auf 59 % und bei 180 min auf 41 %. Hier wird deutlich, daß die größte Wirkung innerhalb der 1. Stunde liegt. Bei 10 min wird das Wachstum schon fast um 20 % gehemmt, bei einer Stunde um fast 40 %.

Versuch 7 (Abb. 15 a und Abb. 15 b)

In diesem Versuch wurde die Wachstumshemmung bei einer Dosis von 10 µg/ml Bleomycin und einer Einwirkungszeit von 1h, 2h, 4h und 6h untersucht.
Aus der Kurve 15 a sieht man das starke Wachstum der Kontrollen im Gegensatz zu den 10 µg/ml-Werten. Die Zellzahl der Kontrollen wuchs um das 3,4-fache, die 1h-Werte um das 1,9-fache, die 2h-Werte um das 1,7-fache, die 4h- und 6h-Werte um das 1,5-fache.
Aus der Kurve 15 b erkennt man deutlich, daß die Hauptwirkung in der 1. Stunde liegt. Hier sinkt das Wachstum auf 60 % ab. In der 2. Stunde sinkt es auf 58 %, in der 4. Stunde auf 47 % und in der 6. Stunde steigt es leicht auf 49 %.

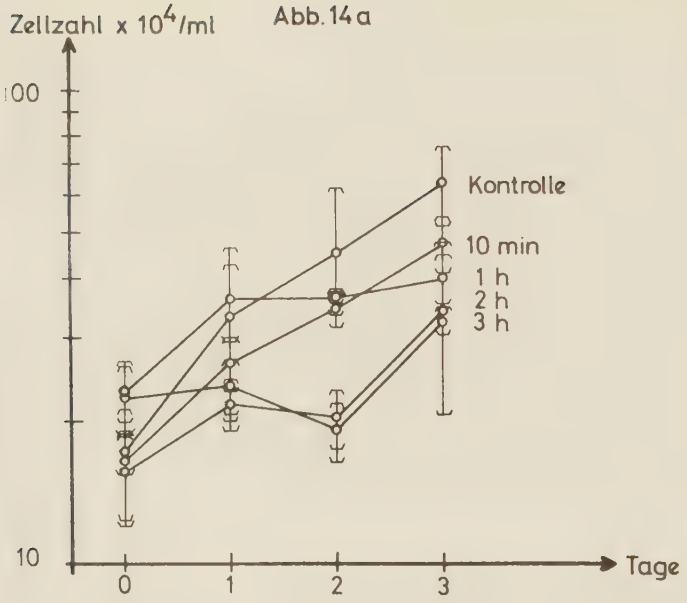



Abb. 14 a:

Wachstum des Yoshida-Sarkoms in vitro unter dem Einfluß von 10 $\mu$g/ml Bleomycin bei verschiedenen Einwirkungszeiten. Jeder Wert stellt das Mittel aus vier verschiedenen Ansätzen dar.

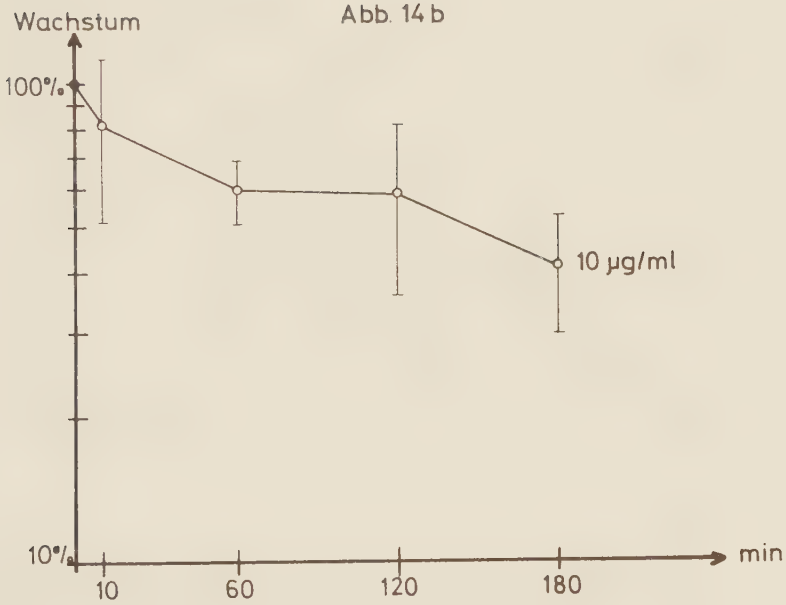



Abb. 14 b:

Ergebnis des Versuchs der Abb. 14 a, dargestellt als prozentuales Wachstum in Abhängigkeit von der Einwirkungszeit.

Abb. 15a

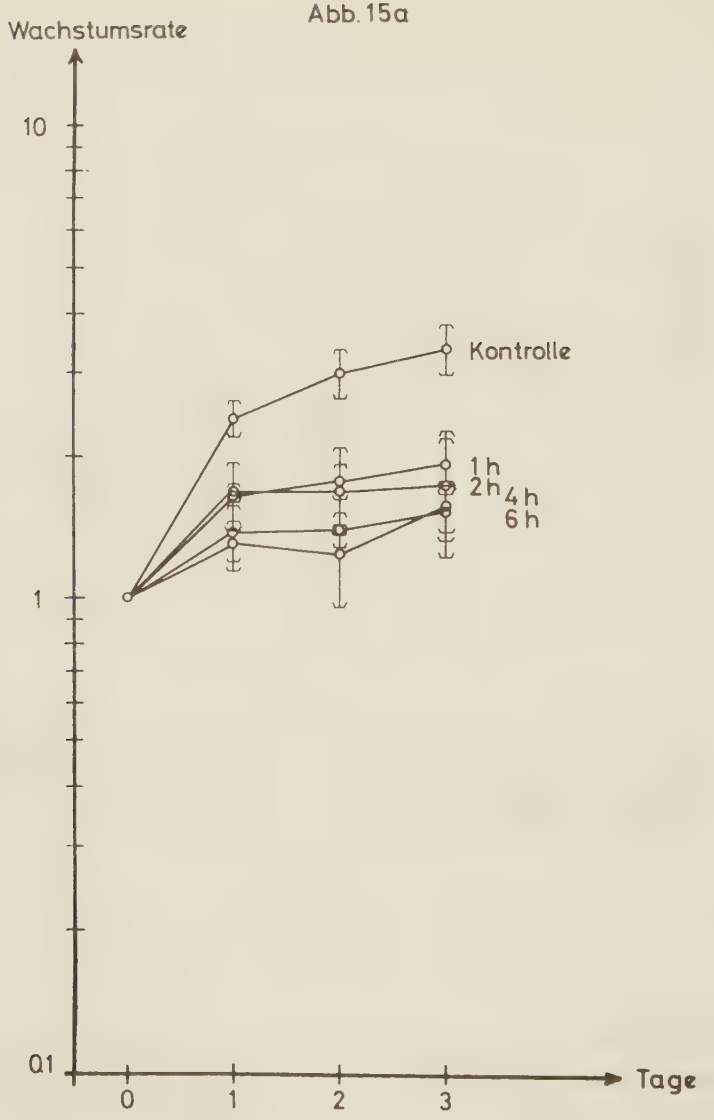



Abb. 15 a:

Wachstum des Yoshida-Sarkoms in vitro unter dem Einfluß von 10 µg/ml Bleomycin bei verschiedenen Einwirkungszeiten. Jeder Wert stellt das Mittel aus vier Ansätzen dar.

Abb. 15 b

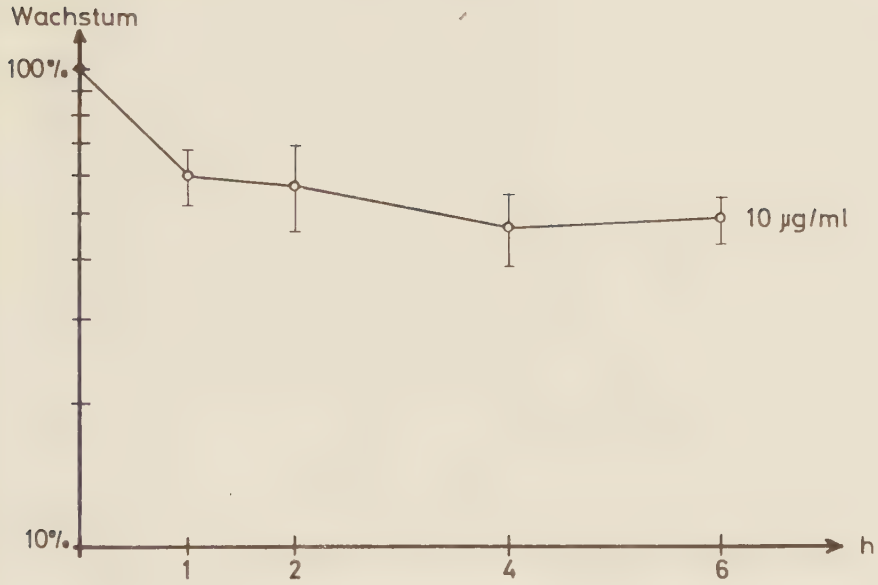



Abb. 15 b:

Ergebnis des Versuchs der Abb. 15 a, dargestellt als prozentuales Wachstum in Abhängigkeit von der Einwirkungszeit.

Zusammenfassung der Bleomycinversuche
(Abb. 16 a und Abb. 16 b)

Die Mittelwerte aller Bleomycinversuche mit einer Einwirkungszeit von 30 min wurden in der Kurve 16 a dargestellt. Hier ist deutlich ein Knick bei 45 % Wachstum und 100 µg/ml Bleomycin zu sehen. Bis zu diesem Wert wird das Wachstum stärker gehemmt, danach bis zu 1 000 µg/ml auf 18 % langsamer. Bei 10 µg/ml Bleomycin liegt das Wachstum bei 82 %.
Die Zeitwirkung von Bleomycin wird in der Kurve 16 b dargestellt, und zwar für 10 µg/ml und für 100 µg/ml Bleomycin. Die größte Wirkung liegt für beide Kurven innerhalb der ersten Stunde. Bei den 10 µg/ml-Werten sinkt das Wachstum in den ersten 10 min auf 70 % ab, bei 1h auf 47 %.
Der 2h-Wert liegt bei 38 %, der 3h-Wert bei 31 %, der 4h-Wert bei 38 % und der 6h-Wert bei 40 %.
Bei den 100 µg/ml-Werten sinkt das Wachstum innerhalb der ersten 10 min auf 45 %, bei 30 min auf 44 %. Nach einer Stunde sinkt es auf 22 % und nach 2h auf 16 %.

Versuch 8 (Abb. 17 a und Abb. 17 b)

In diesem Versuch wurde die Wirkung von $10^{-6}$M/l, $10^{-7}$M/l und $10^{-8}$M/l Methotrexat bei einer Einwirkungszeit von 30 min untersucht.
Die Kurve 17 a zeigt, daß sich die Zellzahl der Kontrollen nach drei Tagen um das 3,5-fache vermehrt, während die Zellen mit $10^{-6}$M/l Methotrexat sich nach einem Tag um etwa 1/3 vermehrten und dann nahezu konstant blieben. Die Zellen mit $10^{-7}$M/l stiegen um das 2,5-fache und die mit $10^{-8}$M/l um das 2,2-fache.
Die Kurve 17 b zeigt ebenfalls die Dosis-Wirkung von Methotrexat in bezug auf das Wachstum. Deutlich zu erkennen ist der Knick bei $10^{-8}$M/l Methotrexat. Bis zu diesem Knick fällt die Kurve sehr steil auf 73 % ab. Danach fällt sie wesentlich langsamer über 67 % bei $10^{-7}$M/l auf 49 % bei $10^{-6}$M/l Methotrexat.

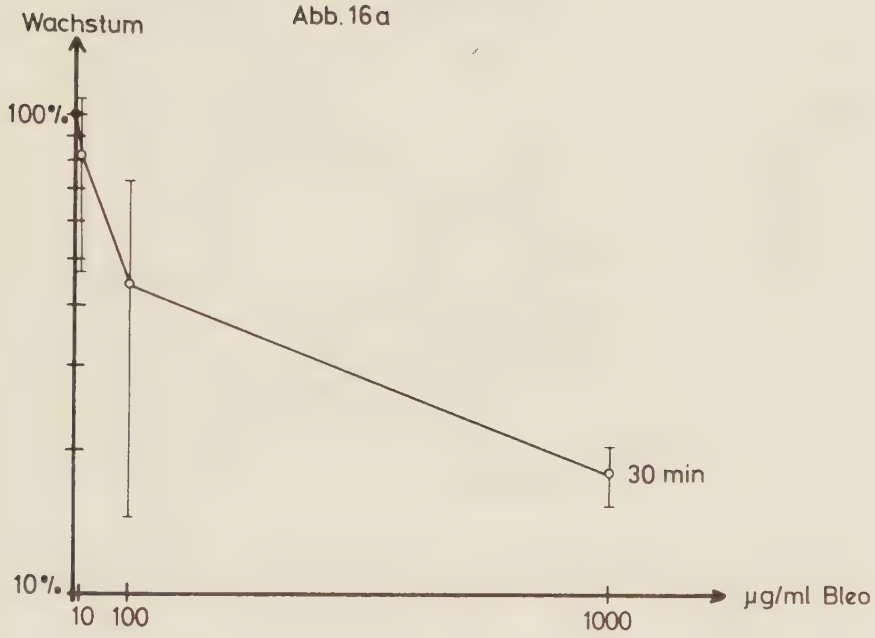



Abb. 16 a:

Zusammenfassung der Bleomycinversuche. Dargestellt wird das prozentuale Wachstum in Abhängigkeit von der Bleomycin-Konzentration, bezogen auf alle Kontrollen (28 Ansätze in 7 Versuchen). Jeder Wert stellt das Mittel aus mehreren Versuchsergebnissen dar (10 µg/ml - 14 Ansätze in 3 Versuchen, 100 µg/ml - 18 Ansätze in 4 Versuchen, 1 000 µg/ml - 15 Ansätze in 3 Versuchen).

Abb. 16 b

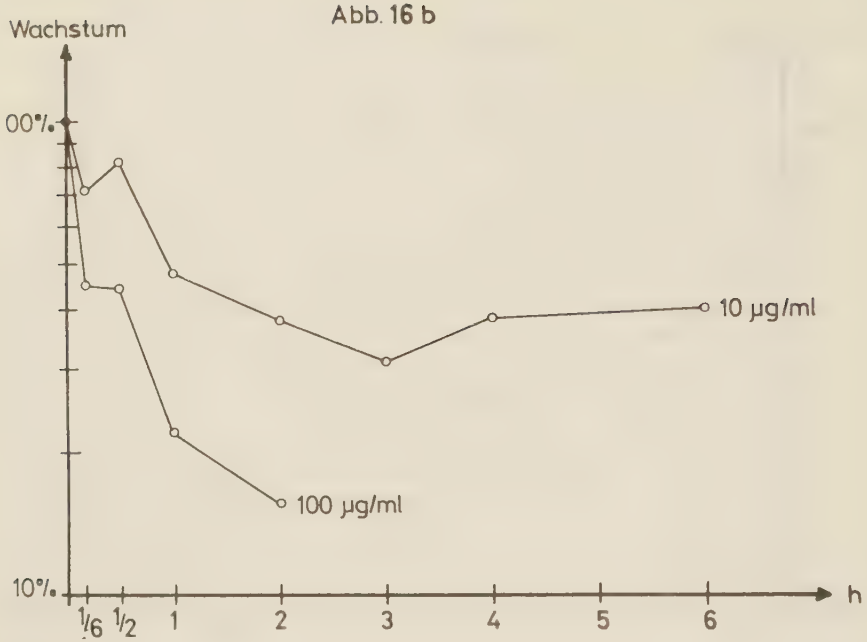



Abb. 16 b:

Zusammenfassung der Bleomycinversuche. Dargestellt wird das prozentuale Wachstum unter dem Einfluß zweier Bleomycin-Konzentrationen in Abhängigkeit von der Einwirkungszeit, bezogen auf alle Kontrollen (28 Ansätze in 7 Versuchen). Jeder Wert stellt das Mittel aus mehreren Versuchsergebnissen dar (10 µg/ml: 10 min - 6 Ansätze in zwei Versuchen, 30 min - 14 Ansätze in drei Versuchen, 1 h und 2 h - je 10 Ansätze in je drei Versuchen, 3 h, 4 h und 6 h je 4 Ansätze in je einem Versuch; 100 µg/ml: 10 min, 1 h und 2 h - je 2 Ansätze in je einem Versuch, 30 min - 18 Ansätze in vier Versuchen).

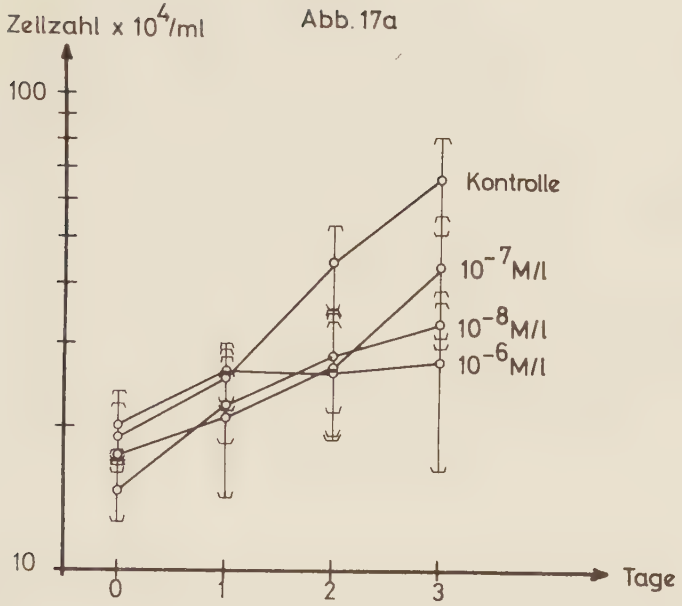



Abb. 17 a:

Wachstum des Yoshida-Sarkoms in vitro unter dem Einfluß verschiedener Methotrexat-Konzentrationen. Jeder Wert stellt das Mittel aus fünf verschiedenen Ansätzen dar (Kontrolle vier Ansätze).

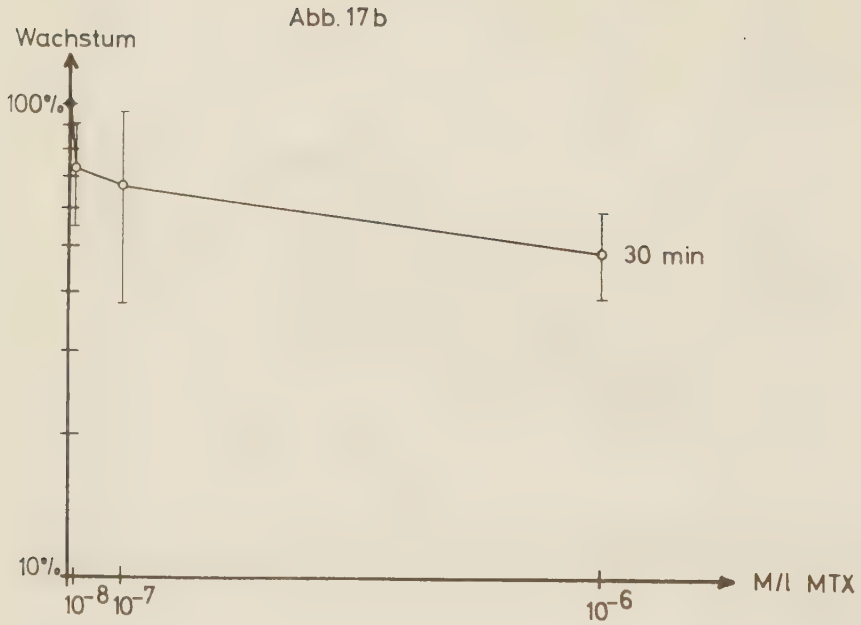



Abb. 17 b:

Ergebnis des Versuchs der Abb. 17 a, dargestellt als prozentuales Wachstum in Abhängigkeit von der Methotrexat-Konzentration.

Versuch 9 (Abb. 18 a und Abb. 18 b)

In diesem Versuch wurde die Wachstumshemmung bei einer Konzentration von $10^{-7}$M/l Methotrexat und den Einwirkungszeiten von 10 min, 1h, 2h und 3h untersucht.
Wie die Kurve 18 a zeigt, vermehrt sich die Zellzahl der Kontrollen um das 2,4-fache, die 10 min-Ansätze um das 1,3-fache, die 1h-Ansätze um das 1,4-fache. Die 2h-Werte blieben nahezu konstant und die 3h-Werte stiegen um das 1,9-fache.
Kurve 18 b zeigt ebenfalls die Zeit-Wirkung in bezug auf die Wachstumshemmung. Die stärkste Wirkung des Methotrexats liegt innerhalb der ersten 10 min. Hier wird das Wachstum auf 61 % gesenkt. Danach verändert sich nicht mehr viel. Bei 60 min liegt ein Wachstumswert von 60 % vor, bei 2h ein Wert von 56 % und bei 3h ein Wert von 75 %.

Versuch 10 (Abb. 19 a und Abb. 19 b)

Dieser Versuch wurde mit einer Konzentration von $10^{-7}$M/l Methotrexat und den verschiedenen Einwirkungszeiten 1h, 2h, 4h und 6h durchgeführt.
Die Kurve 19 a zeigt das starke Wachstum der Kontrollen, deren Zellzahl sich um das Dreifache vermehrt. Der 1h-Wert stieg um fast das Doppelte, der 2h-Wert um das 1,7-fache, der 4h-Wert um das Doppelte (dieser Wert liegt zu hoch). Der 6h-Wert blieb nahezu konstant.
Aus der Zeit-Wirkungskurve 19 b erkennt man wieder, daß die stärkste Wirkung zu Beginn liegt. Bei einer Stunde ist das Wachstum auf 77 % gesenkt, bei 2h auf 66 %. Der 4h-Wert liegt bei 87 % und der 6h-Wert bei 51 %.

Versuch 11 (Abb. 20 a und Abb. 20 b)

Dieser Versuch wurde mit der gleichen Konzentration und den gleichen Einwirkungszeiten durchgeführt wie der vorangegangene ($10^{-7}$M/l : 1h, 2h, 4h, 6h).

Die Kurve 20 a zeigt, daß sich die Zellzahl der Kontrollen um das 4,3-fache vermehrt, während die 1h-Werte nach zwei Tagen sogar stärker anstiegen als die Kontrollen, dann aber wieder absanken und sich deren Zellzahl damit um das 2,6-fache vermehrte. Die 2h-Werte stiegen um das 2,5-fache, die 4h-Werte um das 1,9-fache und die 6h-Werte um das 1,8-fache.
Aus der Kurve 20 b sieht man, daß das Wachstum innerhalb der ersten Stunde auf 81,6 % gesenkt wird. Nach der zweiten Stunde sank es auf 61 %, nach 4h auf 48 % und nach 6h stieg es wieder etwas auf 54 %. Hier ist zu erkennen, daß nach zwei Stunden kaum noch eine Wirkungssteigerung vorliegt.

Zusammenfassung der Methotrexatversuche (Abb. 21 a und Abb. 21 b)

In Kurve 21 a sind alle Mittelwerte mit einer Dosis von $10^{-7}$M/l Methotrexat zusammengefaßt. Es ist deutlich zu erkennen, daß die maximale Wirkung schon nach 10 min erreicht ist. Nach 30 min verändert sich die Kurve kaum noch. Beim 10 min-Wert ist das Wachstum auf 46 % abgesunken. Der 30 min-Wert stieg auf 71 % an, der 1h-Wert liegt bei 74 %, der 2h-Wert bei 60 %, der 3h-Wert bei 56 %, der 4h-Wert bei 68 % und der 6h-Wert bei 58 %.
Die Kurve 21 b zeigt die Dosiswirkung der Mittelwerte aller Methotrexatversuche bei einer Einwirkungszeit von 30 min. Bei $10^{-8}$M/l Methotrexat fällt die Kurve sehr steil ab auf 77 %. Hier ist ein deutlicher Knick zu erkennen, die Kurve verläuft danach flacher. Der $10^{-7}$M/l-Wert liegt bei 71 % und der $10^{-6}$M/l-Wert bei 51 %.

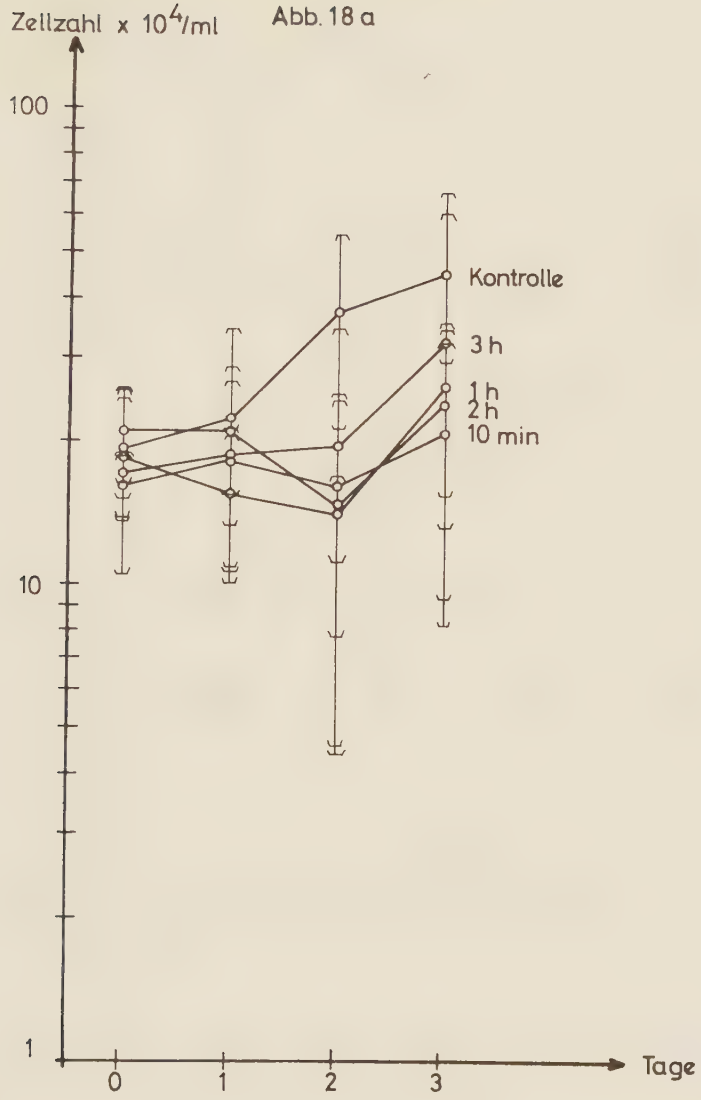



Abb. 18 a:

Wachstum des Yoshida-Sarkoms in vitro unter dem Einfluß von $10^{-7}$ M/l Methotrexat bei verschiedenen Einwirkungszeiten. Jeder Wert stellt das Mittel aus vier verschiedenen Ansätzen dar.

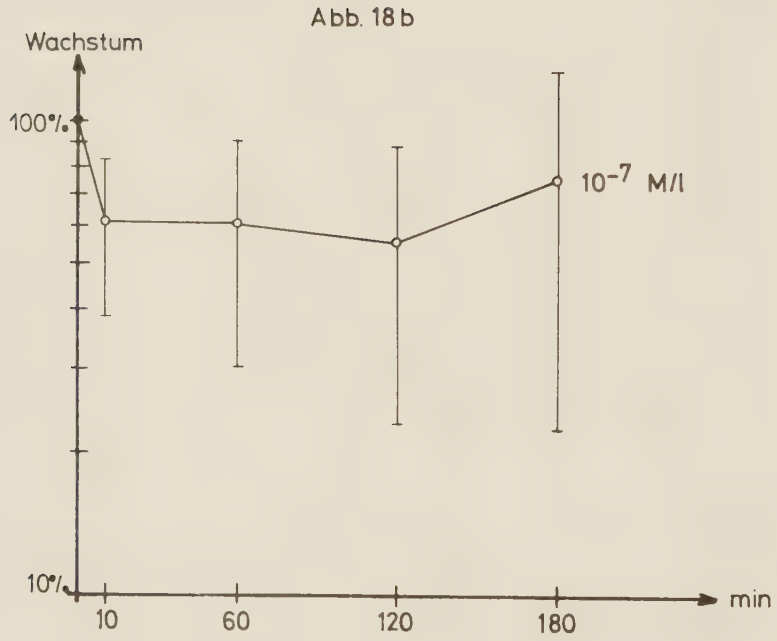



Abb. 18 b:

Ergebnis des Versuchs der Abb. 18 a, dargestellt als prozentuales Wachstum in Abhängigkeit von der Einwirkungszeit.

Abb. 19a

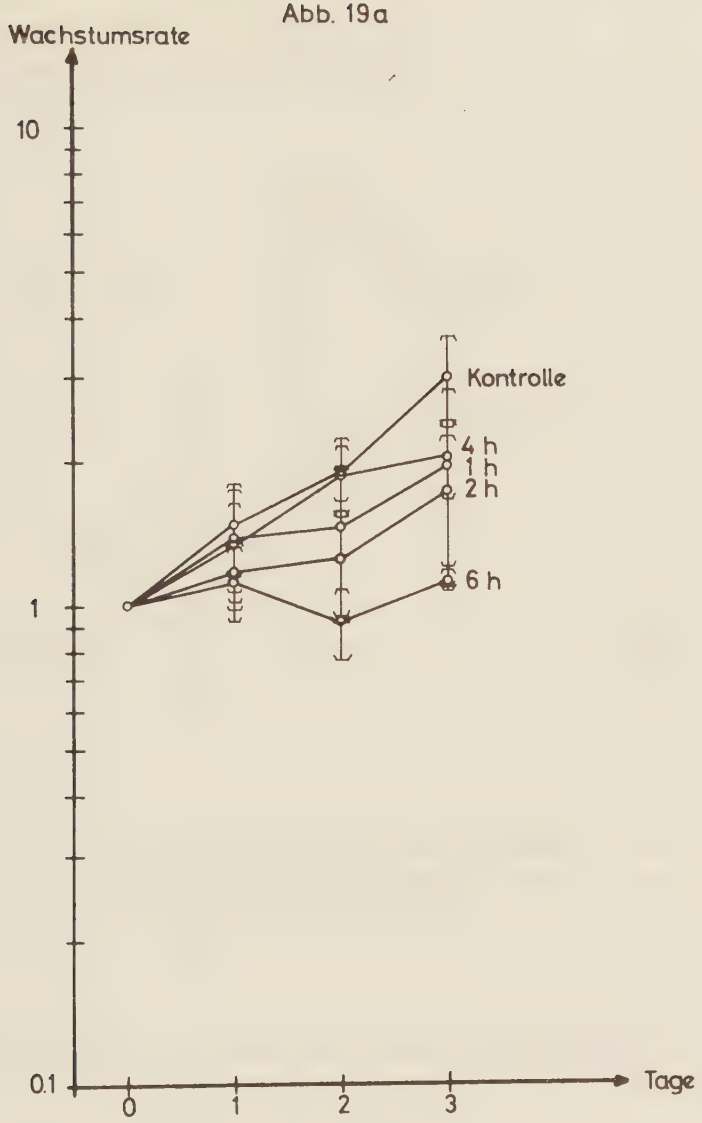



Abb. 19 a:

Wachstum des Yoshida-Sarkoms in vitro unter dem Einfluß von $10^{-7}$ M/l Methotrexat bei verschiedenen Einwirkungszeiten. Jeder Wert stellt das Mittel aus vier verschiedenen Ansätzen dar.

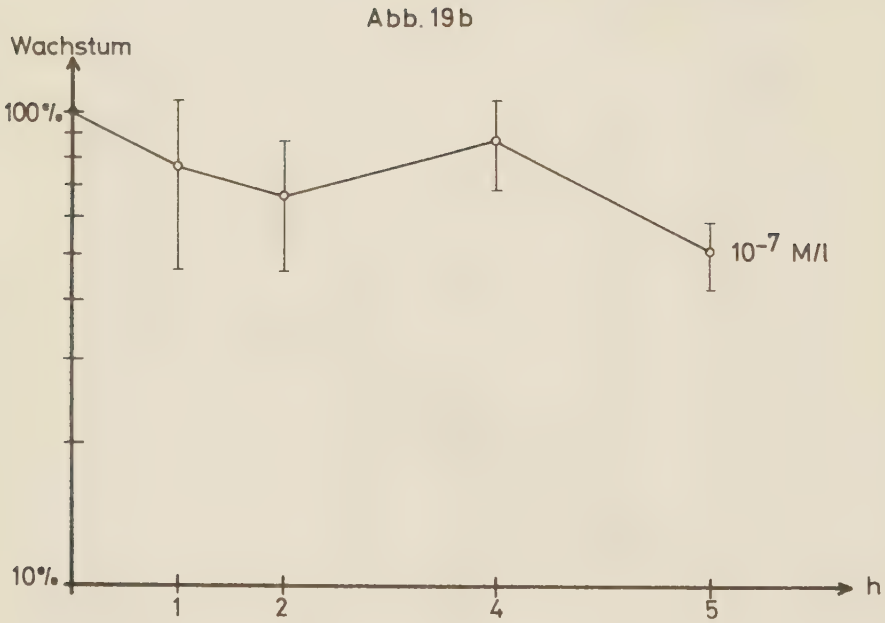



Abb. 19 b:

Ergebnis des Versuchs der Abb. 19 a, dargestellt als prozentuales Wachstum in Abhängigkeit von der Einwirkungszeit.

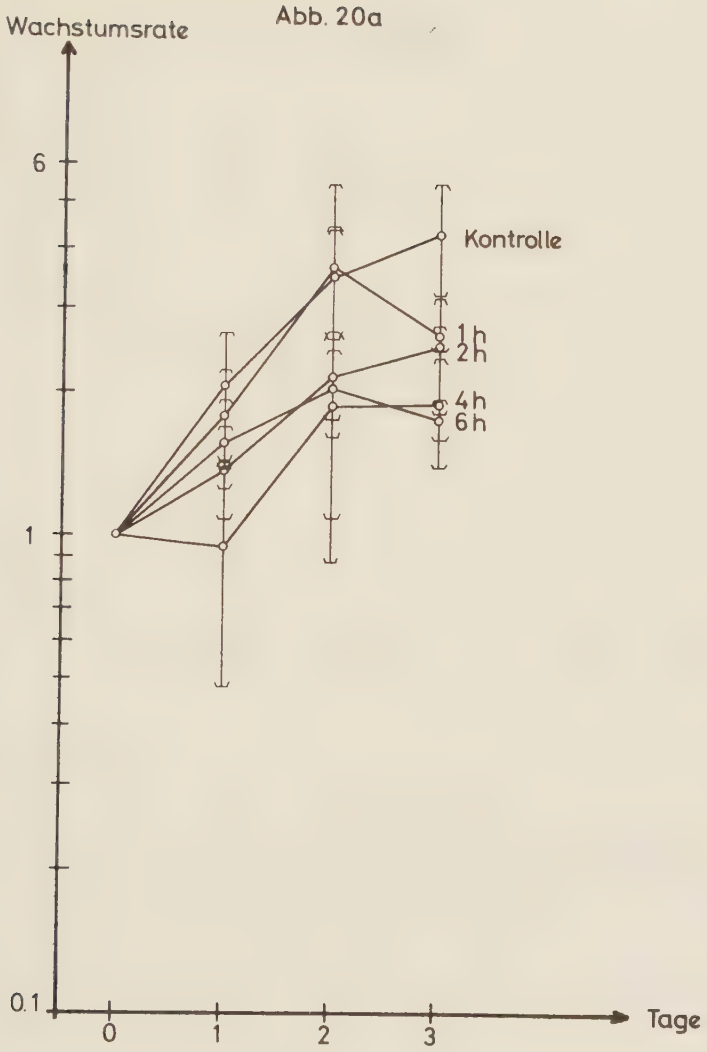



Abb. 20 a:

Wachstum des Yoshida-Sarkoms in vitro unter dem Einfluß von $10^{-7}$ M/l Methotrexat bei verschiedenen Einwirkungszeiten. Jeder Wert stellt das Mittel aus vier verschiedenen Ansätzen dar.

Abb. 20 b

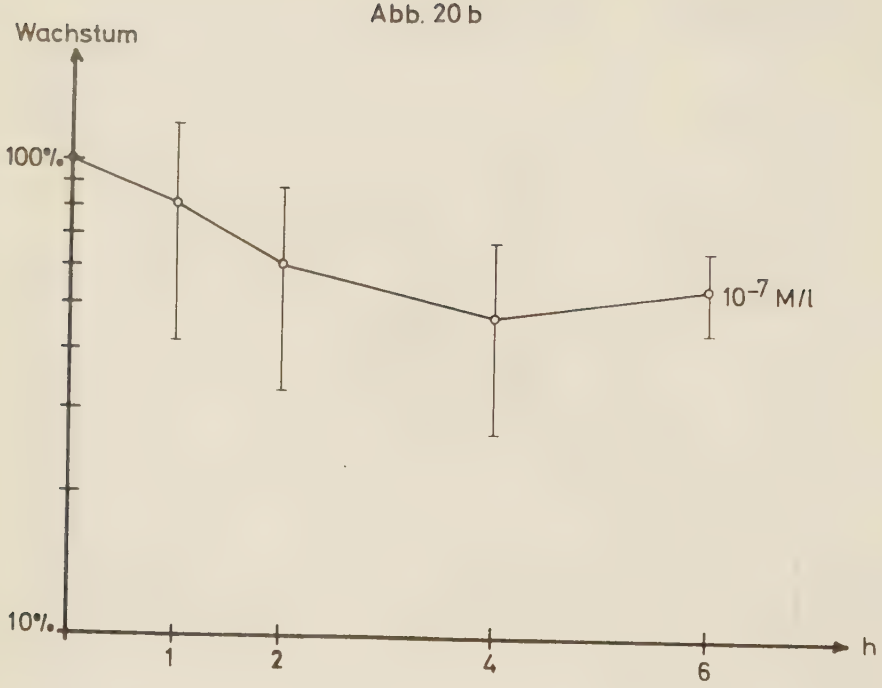



Abb. 20 b:

Ergebnis des Versuchs der Abb. 20 a, dargestellt als prozentuales Wachstum in Abhängigkeit von der Einwirkungszeit.

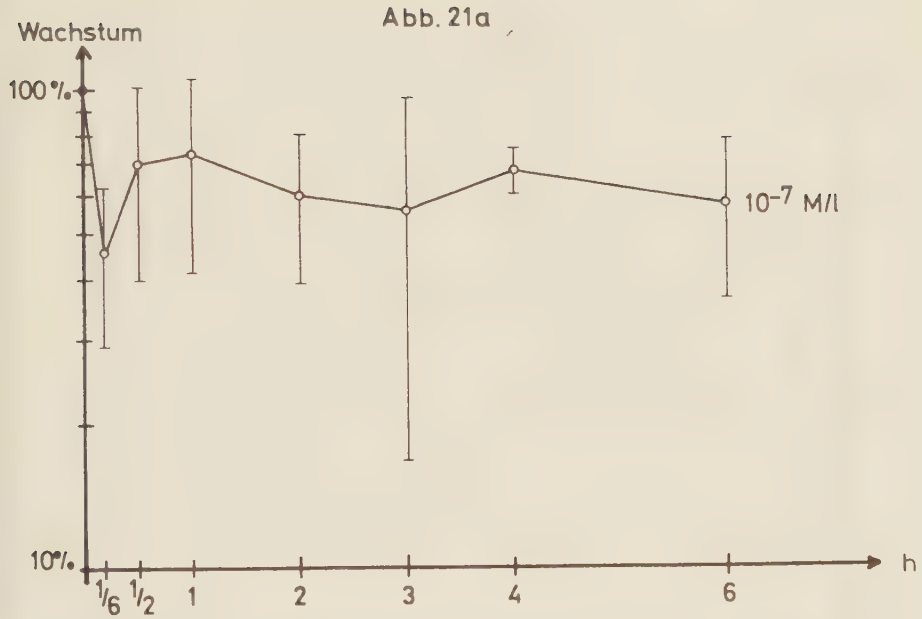



Abb. 21 a:

Zusammenfassung der Methotrexatversuche. Dargestellt wird das prozentuale Wachstum in Abhängigkeit von der Einwirkungszeit und der Methotrexat-Konzentration $10^{-7}$M/l. Jeder Wert stellt das Mittel aus mehreren Versuchsergebnissen dar und wird bezogen auf alle Kontrollen mit 16 Ansätzen in vier Versuchen (10 min - 4 Ansätze in einem Versuch; 30 min - 5 Ansätze in einem Versuch; 1h und 2h - je 12 Ansätze in je drei Versuchen; 4h und 6h- je 8 Ansätze in je zwei Versuchen).

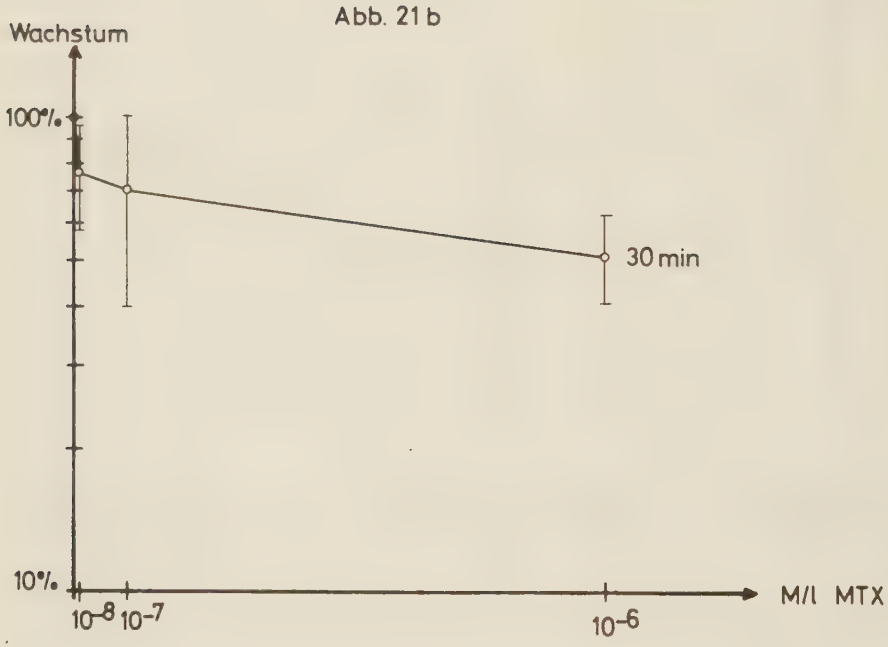



Abb. 21 b:

Zusammenfassung der Methotrexatversuche. Dargestellt wird das prozentuale Wachstum in Abhängigkeit von der Methotrexat-Konzentration. Jeder Wert ist ein Ergebnis des Versuchs der Abb.17a und wird bezogen auf alle Kontrollen (16 Ansätze in vier Versuchen).

Versuch 12 (Abb. 22 a und Abb. 22 b)

Hierbei wurde die Wachstumshemmung bei einer Einwirkungszeit von 30 min und den verschiedenen Dosen 1 µg/ml, 0,1 µg/ml, 0,01 µg/ml und 0,001 µg/ml Vincristin untersucht.

Die Kurve 22 a zeigt das starke Wachstum der Zellen der Kontrollen, die sich um das 4,5-fache vermehrten. Der 0,001 µg/ml-Wert stieg um das Dreifache, während sich der 0,01 µg/ml-Wert um etwa 2/3 verringerte. Der 0,1 µg/ml-Wert liegt zu hoch, hier vermehrten sich die Zellen um das Doppelte. Der 1 µg/ml-Wert sank um etwa 1/6.
Die Dosis-Wirkungskurve 22 b zeigt zu Beginn einen sehr steilen Abfall. Bei einer Dosis von 0,001 µg/ml Vincristin wurde das Wachstum auf 68 % und bei einer Dosis von 0,01 µg/ml bereits auf 14 % Wachstum gesenkt. Hier ist ein deutlicher Knick erkennbar, denn von diesem Punkt fällt die Kurve nur noch langsam ab. Bei 1 µg/ml ist sie auf 10 % gesunken.

Versuch 13 (Abb. 23 a und Abb. 23 b)

In diesem Versuch wurde die Zeitwirkung von 0,01 µg/ml Vincristin bei einer Einwirkungszeit von 1h, 2h, 4h und 6h untersucht.
Aus der Kurve 23 a ist das starke Wachstum der Zellen der Kontrollen zu erkennen, die sich um das Dreifache vermehrten. Die 1h-Werte stiegen um das 1,5-fache, die 2h-Werte um das 1,3-fache, während die 4h-Werte um knapp die Hälfte und die 6h-Werte um gut die Hälfte sanken.
Die Kurve 23 b zeigt, daß die stärkste Wirkung innerhalb der ersten Stunde liegt und ab der vierten Stunde nur noch gering ist. Nach einer Stunde sank das Wachstum auf 64 %, nach zwei Stunden auf 49 %, nach 4h auf 29 % und nach 6h auf 25 % ab.

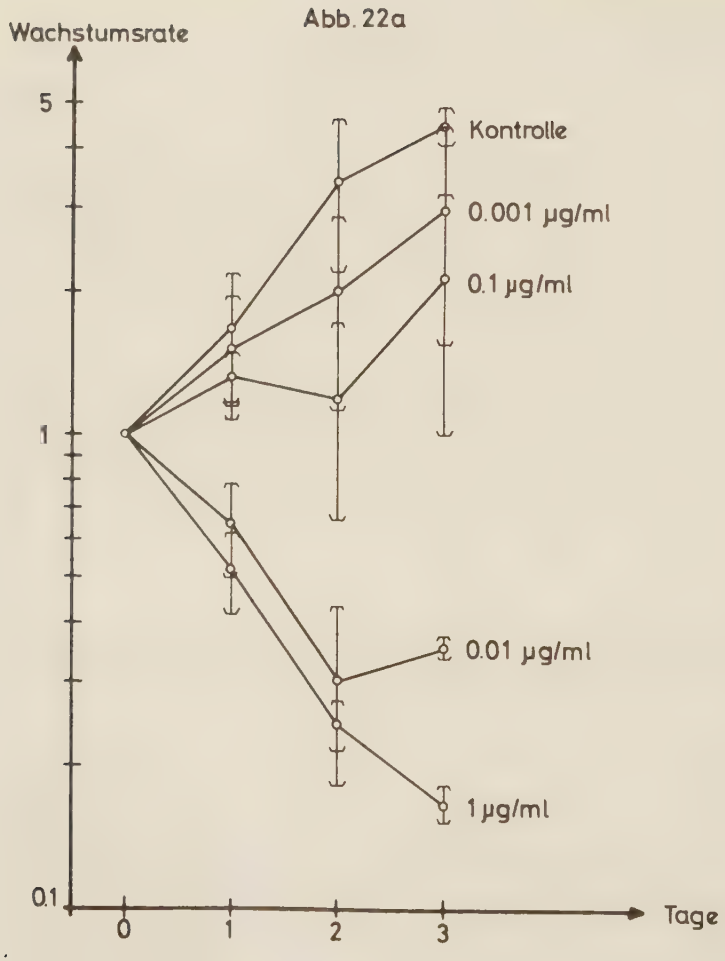



Abb. 22 a:

Wachstum des Yoshida-Sarkoms in vitro unter dem Einfluß verschiedener Vincristin-Konzentrationen. Jeder Wert stellt das Mittel aus vier verschiedenen Ansätzen dar (0,01 µg/ml 3 Ansätze).

Abb. 22b

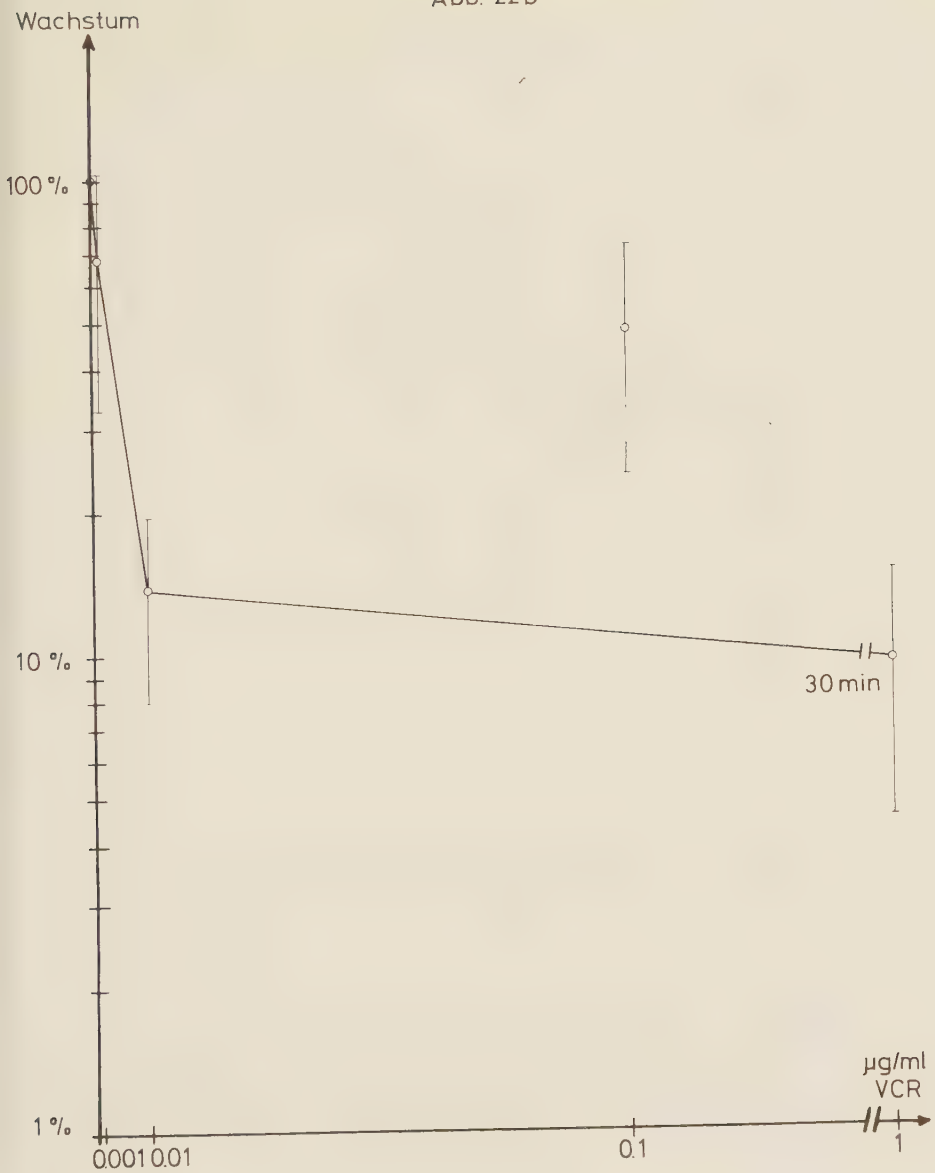



Abb. 22 b:

Ergebnis des Versuchs der Abb. 22 a, dargestellt als prozentuale Wachstumshemmung in Abhängigkeit von der Vincristin-Konzentration.

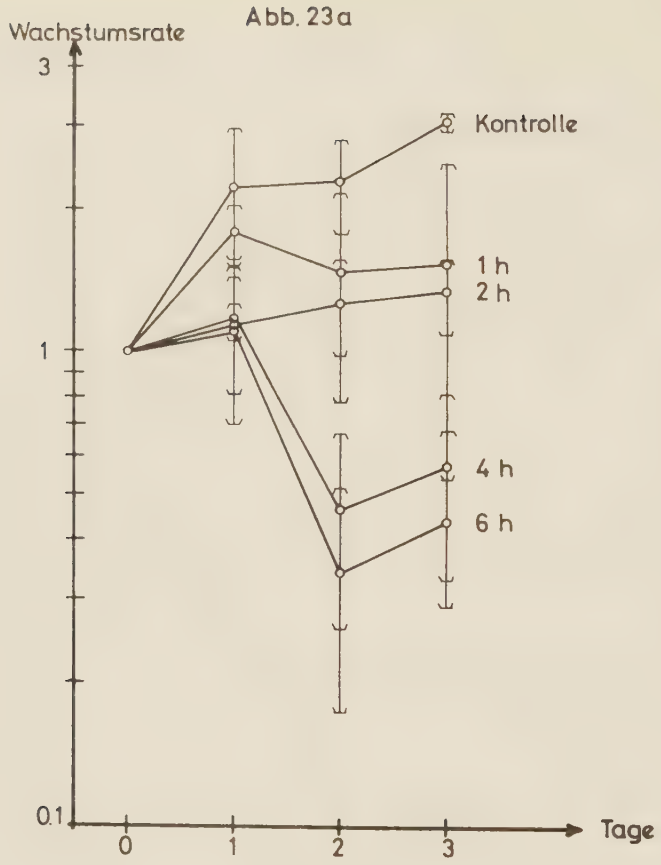



Abb. 23 a:

Wachstum des Yoshida-Sarkoms in vitro unter dem Einfluß von 0,01 µg/ml Vincristin bei verschiedenen Einwirkungszeiten. Jeder Wert stellt das Mittel aus vier verschiedenen Ansätzen dar (4h - 3 Ansätze).

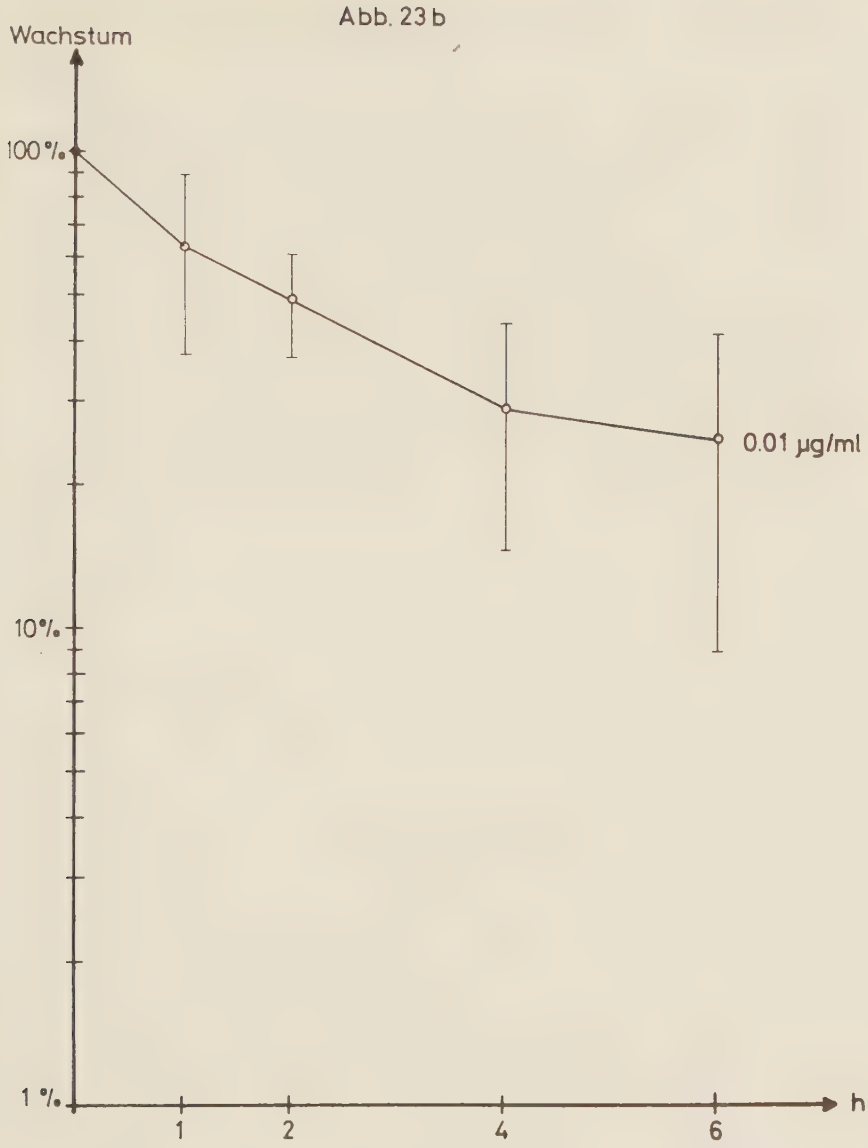



Abb. 23 b:

Ergebnis des Versuchs der Abb. 23 a, dargestellt als prozentuale Wachstumshemmung in Abhängigkeit von der Einwirkungszeit.

Zusammenfassung der Vincristinversuche (Abb. 24 a und Abb. 24 b)

Die Mittelwerte der Vincristinversuche mit einer Dosis von 0,01 µg/ml werden in Kurve 24 a dargestellt. Sie zeigt, daß die größte Wirkung innerhalb der ersten Stunde liegt und daß nach vier Stunden die Wirkung gering ist. Nach einer Stunde fällt die Kurve auf 56 %, nach 2h auf 43 %, nach 4h auf 26 % und nach 6 h auf 22 % ab.
Kurve 24 b zeigt die Mittelwerte der Vincristinversuche mit einer Einwirkungszeit von 30 min. Zu Beginn hat die Kurve einen sehr steilen Abfall. Der 0,001 µg/ml-Wert liegt bei 76 % Wachstum und der 0,01 g/ml-Wert ist bereits auf 15 % gefallen. Hier ist nun ein deutlicher Knick zu sehen, die Kurve verläuft jetzt wesentlich flacher. Der 1 µg/ml-Wert liegt bei 11 %.

Abb. 24 a

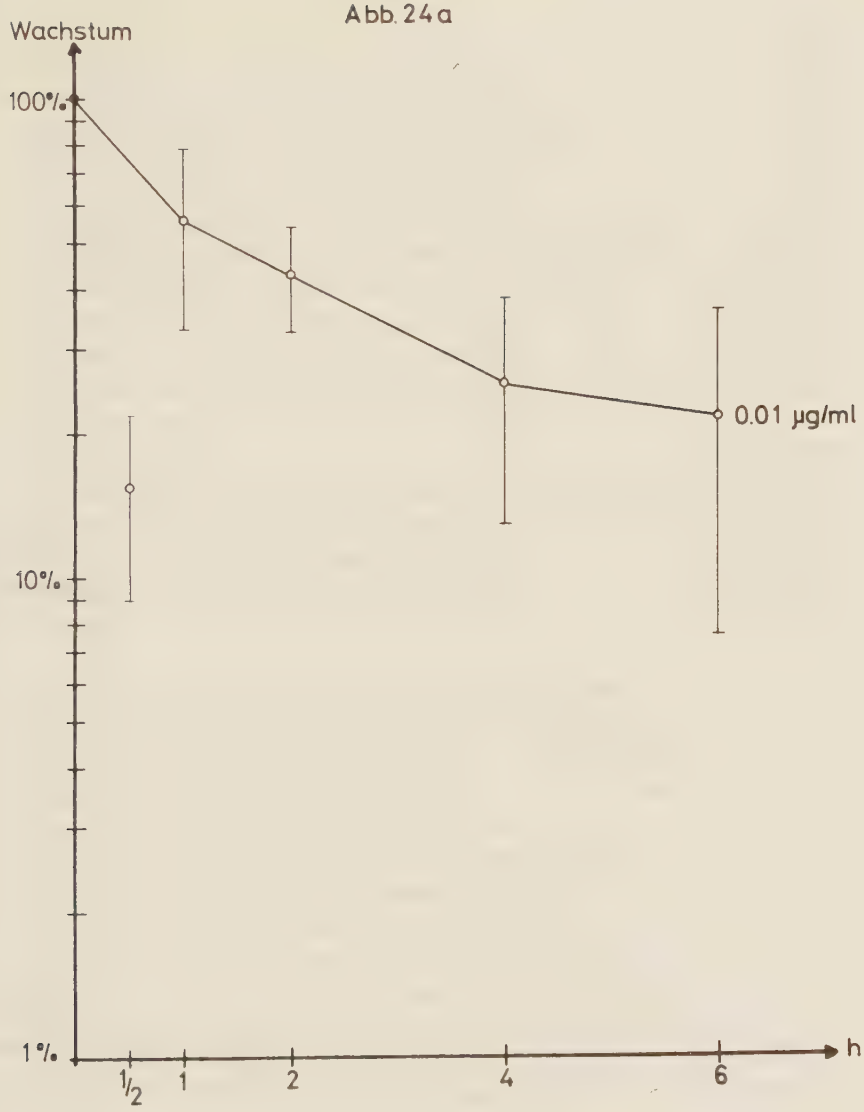



Abb. 24 a:

Zusammenfassung der Vincristinversuche. Dargestellt wird die prozentuale Wachstumshemmung unter dem Einfluß von 0,01 µg/ml Vincristin in Abhängigkeit von der Einwirkungszeit. Jeder Wert ist ein Ergebnis aus den Versuchen der Abb. 22 b und 23 b und wird bezogen auf alle Kontrollen beider Versuche (8 Ansätze).

Abb. 24b

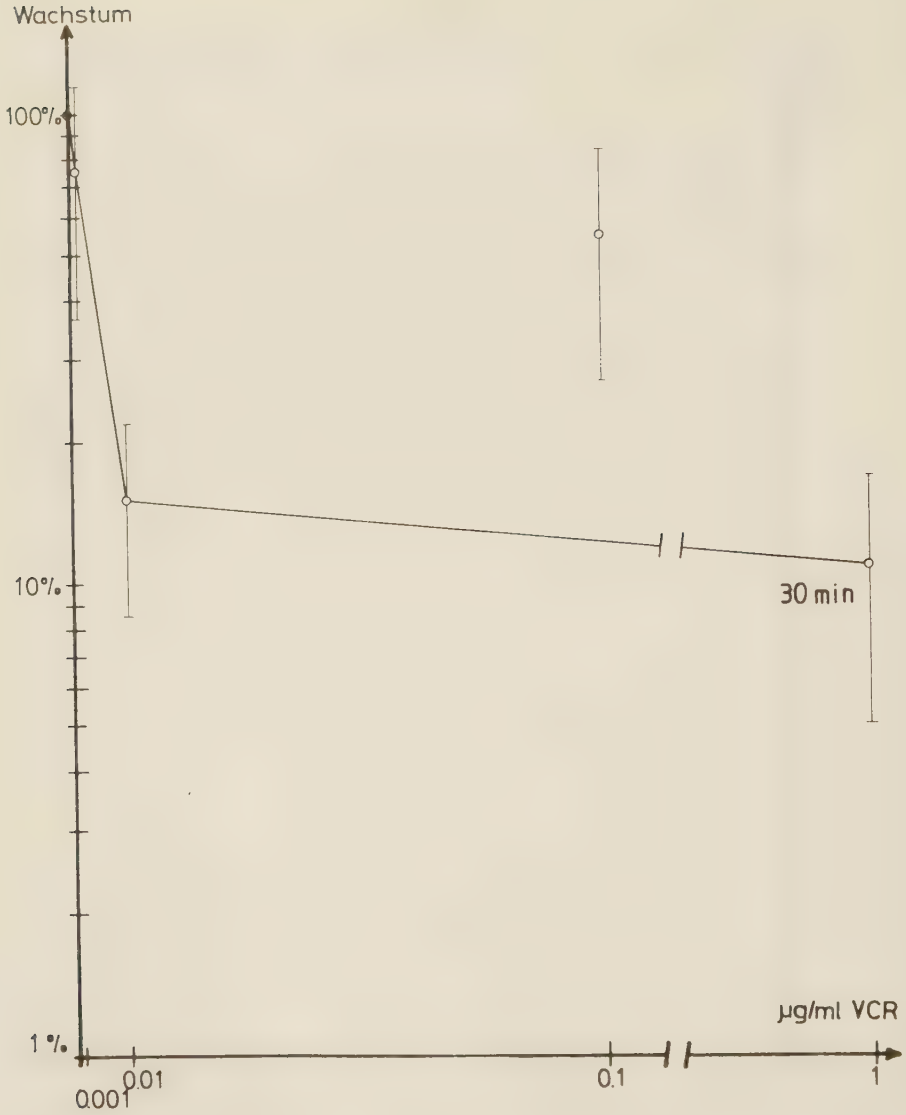



Abb. 24 b:

Zusammenfassung der Vincristinversuche. Dargestellt wird die prozentuale Wachstumshemmung in Abhängigkeit von der Vincristin-Konzentration. Jeder Wert ist ein Ergebnis aus dem Versuch der Abb. 22 b und wird bezogen auf alle Kontrollen der Vincristinversuche (8 Ansätze in zwei Versuchen).

Diskussion

Zur Beurteilung der eigenen Versuche hat sich eine optimale Bleomycin-Dosis von 10 µg/ml erwiesen.

Barranco et al. (2) haben unter anderem die Empfindlichkeit asynchroner CHO-Zellen auf Gaben verschiedener Bleomycindosen bei einer Einwirkungszeit von einer Stunde dargestellt. Dieses Ergebnis stimmt nahezu mit den eigenen Untersuchungen aus Versuch 1 (Abb. 9 b) und Versuch 3 (Abb. 11 b) überein. Die Mittelwerte der Zusammenfassung aller Bleomycinversuche liegen etwas höher als bei Barranco.

Matsuzawa et al. (11) haben die Dosiswirkung von Bleomycin an Hand des Wachstums von FM3A-Zellen bei einer Einwirkungszeit von einer Stunde dargestellt. Der Verlauf dieser Kurve entspricht fast dem Verlauf der Dosiswirkung der eigenen Mittelwerte aller Bleomycinversuche.

Drewinko et al. (6) untersuchten die Wirkung von Bleomycin an $T_1$-Zellen. Die Dosiswirkungskurve zeigt mit etwa 9,5 % Wachstum einen sehr niedrigen Wert für 100 µg/ml Bleomycin und einer Einwirkungszeit von einer Stunde. Der niedrigste 100 µg/ml-Wert der eigenen Untersuchungen liegt bei 29,5 %, der höchste bei 64,7 % Wachstum bei einer Einwirkungszeit von 30 min. Die Zeitwirkungskurve stellt die Wirkung von 50 µg/ml Bleomycin über einen Zeitraum von 35 Stunden dar. Die eigenen Untersuchungen erstrecken sich für 10 µg/ml über maximal sechs Stunden und für 100 µg/ml über zwei Stunden. Drewinkos Arbeit führt zu dem Ergebnis, daß das Wachstum nach einer Stunde auf etwa 20 %, nach vier Stunden auf etwa 10 %, und nach 35 Stunden auf 0,06 % Wachstum sinkt.

Mauro et al. (12 und 14) untersuchten unter anderem die Wirkung des Bleomycins auf Chinesische-Hamster-Zellen in der exponentiellen Wachstums- und in der Plateau-Phase. Die Dosiswirkungskurven zeigen die Werte bei den Einwirkungszeiten von einer bzw. zwei Stunden und verschiedene Dosen zwischen einem und 20 µg/ml Bleomycin. Diese Kurven weisen lediglich eine obere Konkavität auf, aber den biphasischen Verlauf stellen sie nicht dar. Als Vergleichswert zeigt der 10 µg/ml-Wert, daß Mauros Ergebnisse für eine und zwei Stunden Einwirkungszeit niedriger liegen als die eigenen. Die Zeitwirkungskurven stellen das Verhalten der exponentiell-wachsenden und das der Plateau-Phasen-Zellen mit einer Bleomycindosis von 10 µg/ml bis zu einer Einwirkungszeit von 10 Stunden dar. Auch diese Werte der exponentiell-wachsenden-Zellen liegen niedriger als die der eigenen Ergebnisse.

Terasima et al. (15 und 16) untersuchten an vier Zellarten die unterschiedliche Sensibilität gegenüber Bleomycin. Die Dosiswirkungskurve reicht bei einer Einwirkungszeit von 60 min bis 50 µg/ml Bleomycin. Alle vier Kurven zeigen anfangs eine stärkere exponentielle Inaktivierung, die sich in einem flachen Kurventeil fortsetzt. Die dadurch entstandenen Knicke der biphasischen Kurven liegen zwischen 5 und 10 µg/ml Bleomycin. Die Endneigungen bei 50 - 60 µg/ml sind für alle vier ähnlich. Für B16-XI-, L5- und Vero-Zellen liegt das Wachstum etwa bei 30 %, für P 388-Zellen bei etwa 60 %. Die Ergebnisse der eigenen Untersuchungen sind mit denen für die P 388-Zellen zu vergleichen, die Ergebnisse der anderen drei Zellarten liegen niedriger.
Die Zeitwirkung wurde nur an L5-Zellen untersucht. Es wurden 5, 10, 20 und 50 µg/ml Bleomycindosen verwendet und bis zu einer Einwirkungszeit von vier Stunden aufgezeichnet. Alle vier Kurven fallen in den ersten 15 min steil ab und nach 60 min beginnt bei allen die Endneigung, die flacher verläuft. Diese Ergebnisse liegen, wie nach dem Vergleich der Dosiswirkungskurven zu erwarten war, niedriger als die der eigenen Untersuchungen, gleichen ihnen aber prinzipiell.

Barranco et al. (1) untersuchten die Bleomycinwirkung auf die verschiedenen Phasen des Zellzyklus und auf die asynchronen Chinesischen-Hamster-Zellen. Die Dosiswirkungskurve stellt die Bleomycinwirkung für Dosen bis 100 µg/ml bei einer Einwirkungszeit von 30 min dar. Die biphasische Kurve zeigt bei 10 µg/ml einen Knick; hier liegt das Wachstum bei etwa 48 %. Für 100 µg/ml liegt es bei etwa 22 %. Der Verlauf dieser Kurve ist dem der eigenen Darstellungen sehr ähnlich. Die Werte liegen allerdings niedriger als die eigenen. Die Zeitwirkungskurve für asynchron wachsende Zellen geht über zwei Stunden bei einer Dosis von 100 µg/ml Bleomycin. Nach 20 min ist das Wachstum bereits auf etwa 32 % gesunken, nach einer Stunde auf etwa 28 % und nach zwei Stunden auf etwa 22 %. Dieses Ergebnis ist nahezu identisch mit dem eigenen.

Terasima und Umezawa (17) untersuchten die Wirkung von Bleomycin A2 auf L5- und S3-Zellen, und von Bleomycin A5 auf S3-Zellen. L5-Zellen wurden mit Dosen von 5 µg/ml bis 30 µg/ml Bleomycin A2 mit einer Einwirkungszeit von 30 min behandelt. Die Dosiswirkungskurve verläuft flacher als die der eigenen Untersuchungen. Auch die Werte der dazugehörigen Zeitwirkungskurve mit einer Dosis von 10 µg/ml Bleomycin A2 liegen niedriger. S3-Zellen wurden mit Bleomycin A5-Dosen von 5 bis 20 µg/ml bei einer Einwirkungszeit von 60 min behandelt. Die Dosiswirkungskurven laufen nahezu parallel zueinander, dabei zeigt sich, daß die Bleomycin A5-Dosen etwas wirksamer sind. Im Vergleich zu den eigenen Untersuchungen ist zu sagen, daß die Werte fast identisch miteinander sind. Die Zeitwirkungskurve mit der Bleomycin A5-Dosis 10 µg/ml verläuft ebenfalls nahezu wie die der eigenen Untersuchungen.

Für Methotrexat hat sich zur Beurteilung der eigenen Versuche eine optimale Dosis von $10^{-7}$ M/l erwiesen.

Hill et al. (7) untersuchten die Wirkung von Methotrexat gegenüber sensiblen und resistenten L5178Y-Zellen. Die Dosiswirkungskurve für sensible Zellen und einer Einwirkungszeit

von 24 Stunden zeigt für $10^{-8}$M/l Methotrexat einen Wert von 88 % Wachstum, für $10^{-7}$M/l bereits 30 = und für $10^{-6}$M/l 7 %. Die entsprechenden Kurven der eigenen Untersuchungen haben eine Einwirkungszeit von 30 min. Sie zeigen für $10^{-8}$M/l Methotrexat einen steilen Abfall, der dann langsam ausläuft.

Borsa und Whitmore (4) untersuchten die Wirkung des Methotrexats an L60TM-Zellen. Die Einwirkungszeit bei der Dosiswirkungskurve beträgt 72 Stunden. Bei einer Dosis von $10^{-8}$g/ml (= 2,2 x $10^{-8}$M/l) sinkt das Wachstum von $10^5$ auf 1,5 x $10^4$Zellen/ml. Bei $10^{-7}$g/ml (= 2,2 x $10^{-7}$M/l) ist das Wachstum auf 2 x $10^3$ Zellen/ml gesunken. Bei diesem Wert bleibt das Wachstum auch für die Dosen $10^{-6}$ und $10^{-5}$g/ml bestehen. Diese Kurve ist nicht direkt mit denen eigener Untersuchungen zu vergleichen, da die verschiedenen Einwirkungszeiten zu weit auseinanderliegen. Als Gemeinsamkeit kann man sagen, daß die Dosis $10^{-7}$M/l eine rasche Hemmung des Wachstums bewirkt und daß eine Steigerung der Dosis auf $10^{-6}$M/l keine große Änderung mehr bewirkt. Die Zeitwirkungskurve zeigt bei einer Dosierung von $10^{-6}$g/ml Methotrexat (= 2,2 x $10^{-6}$M/l) in den ersten fünf Stunden keine Veränderung. Nach etwa 12 Stunden ist die Zellzahl von 8 x $10^4$ Zellen/ml auf 5 x $10^4$Zellen/ml und nach 20 Stunden auf 3 x $10^4$ Zellen/ml gesunken. Danach bleibt sie nahezu konstant. Die eigenen Untersuchungen zeigen die größte Wirkung innerhalb von zwei Stunden, nach fünf Stunden ist kaum noch eine Wirkungssteigerung vorhanden.

Hryniuk (8) stellt im Rahmen seiner Untersuchungen die Wirkung von $10^{-6}$M/l Methotrexat auf L5178Y-Leukämie-Zellen dar. Nach zwei Stunden ist das Wachstum auf 71 %, nach vier Stunden auf 50 % und nach sieben Stunden auf 10 % gesunken. Nach 12 Stunden beträgt es noch 4,5 % und nach 24 Stunden 1 %. Auch dieses Ergebnis unterscheidet sich von den eigenen Untersuchungen, denn eine solch niedrige Zellzahl wurde nicht erreicht.

Bruce et al. (5) untersuchten unter anderem die Wirkung von Amethopterin und Vincristin in einem in vivo-Versuch. Mäusen wurden verschiedene Zytostatika injiziert und nach einer bestimmten Zeit getötet. Das Wachstum der koloniebildenden Zellen des Knochenmarks wurde untersucht.
Die Dosiswirkungskurven für Methotrexat zeigen bei einer Einwirkungszeit von 24 und 48 Stunden einen Knick bei 0,5 mg/24 Stunden. Danach verläuft die Kurve konstant. Das Wachstum der hematopoetischen Zellen ist dann von $1,5 \times 10^3$ CFU/Femur auf etwa $4 \times 10^2$ CFU/Femur gefallen. Die dazugehörige Zeitwirkungskurve für 1 bzw. 3 mg/24h zeigen ein Abfallen in den ersten 12 Stunden. Die Zellzahl ist hier von $1,5 \times 10^3$ auf $2 \times 10^2$ gefallen. Danach verläuft die Kurve konstant.
Die Dosiswirkungskurve für Lymphoma-Zellen zeigt bei etwa 1 mg/24 h einen Knick, die Zellen sind von $3 \times 10^4$ auf 20 CFU/Femur gefallen und die Kurve verläuft dann gleichbleibend weiter. Die Zeitwirkungskurve zeigt für eine Dosis von 3 mg/24h einen Knick bei etwa 12 Stunden. Die Zellen sind von $2 \times 10^4$ auf 30 CFU/Femur gefallen. Nach diesem Knick fällt die Kurve weiter langsam ab, nach 72 Stunden ist die Zellzahl auf etwa $4 \times 10^{-1}$ CFU/Femur gefallen.

Generell kann man diese Versuchsergebnisse nicht mit den eigenen vergleichen, da hier ganz verschiedene Bedingungen vorliegen. Aber man kann die Kurven insofern mit den eigenen vergleichen, da bei allen ein sehr steiler anfänglicher Abfall der Kurven vorliegt, der dann langsam ausläuft bzw. konstant bleibt.

Zur Beurteilung der eigenen Versuche hat sich eine optimale Vincristin-Dosis von 0,01 µg/ml erwiesen.

Auch die Versuchsergebnisse von Bruce et al. (5) über Vincristin sind nicht direkt vergleichbar. Aber auch hier läßt sich eine gewisse Ähnlichkeit der Kurven mit den eigenen feststellen. Die Dosiswirkungskurven zeigen anfangs einen steilen Abfall und verlaufen nach einem Knick kaum fallend bzw. fast konstant weiter. Die Zeitwirkungskurven zeigen ein kontinuierliches Abfallen.

Madoc-Jones und Mauro (10) untersuchten die Wirkung von Vinblastin und Vincristin an synchronisierten Hela- und Chinesische-Hamster-Zellen. Die Dosiswirkungskurve für synchronisierte Hela-Zellen zeigt bei einer Einwirkungszeit von drei Stunden, daß die Zellen in der S-Phase empfindlicher auf Vincristin reagieren, als die Zellen in der frühen $G_1$- und der späten $G_1$-Phase. Für alle drei Kurven wird ein Knick bei einer Dosis von 0,01 µg/ml Vincristin deutlich. Für die Zellen in der $G_1$- und späten $G_1$-Phase sinkt hier das Wachstum auf 60 %, bei einer Dosis von 0,1 µg/ml auf 10 %. Das Wachstum der Zellen in der S-Phase sinkt bei einer Dosis von 0,01 µg/ml auf 13 % und bei einer Dosis von 0,1 µg/ml auf 0,4 %. Die eigenen Untersuchungen wurden mit asynchronen Zellen durchgeführt. Aber auch hier ist bei einer Dosis von 0,01 µg/ml deutlich ein Knick zu sehen. Alle Kurven zeigen also einen biphasischen Verlauf.

Bleomycin, Methotrexat und Vincristin weisen also in der Dosiswirkungsbeziehung gegen das Yoshida-Sarkom untereinander eine große Ähnlichkeit auf. Offensichtlich existieren zwei Tumorzellpopulationen, von denen eine sehr empfindlich reagiert, während die andere wesentlich widerstandsfähiger ist.

Dieselbe Beobachtung läßt sich bei der Zeit-Wirkungsbeziehung machen. Auch hier liegen zwei Zellpopulationen vor, von denen die eine in kurzer Zeit durch ein Zytostatikum vernichtet wird, während eine andere auch bei langer Exposition kaum geschädigt wird. Vincristin scheint eine Ausnahme zu machen; zwar liegt keine lineare Korrelation zwischen Zellschädigung und Einwirkungszeit vor, aber die verlängerte Exposition der Tumorzellen führt zu einer gleichmäßig steigenden Zellvernichtungsrate.

Obwohl die Übertragung von Befunden an Experimentaltumoren auf die Situation der Spontantumoren viele Probleme enthält, geben sie uns doch einige praktische Hinweise:

1) Jede Geschwulst hat eine ihr zugehörige Empfindlichkeit gegen ein bestimmtes Zytostatikum. Die Steigerung der Dosis führt jenseits der individuell kritischen Grenze kaum noch zu gesteigerter Zellvernichtung.

2) Ebenfalls die Expositionsdauer, die zu maximaler Tumorzellabtötung erforderlich ist, scheint determiniert zu sein (Ausnahme: Vincristin). Das heißt, die Verlängerung der Einwirkungszeit über eine individuell bestimmte Größe steigert die Zellvernichtung nur unwesentlich. Zur Erklärung dieses Phänomens lassen sich unter anderem die Zellzyklus-Phasenspezifische Wirkung der Zytostatika oder die Resistenz von Zellen, die nicht an der Proliferation teilnehmen ($G_0$-Zellen) heranziehen.

Für die klinische Situation lassen sich zwei mögliche Schlußfolgerungen ziehen:

1) Um die resistente Zellpopulation der bösartigen Geschwulst zu vernichten, bedarf es einer extrem verlängerten Expositionszeit oder

2) die Therapie sollte in kurzen Intervallen erfolgen, deren Frequenz vom Erholen der Zellen von resistenten in empfindlichen Phasen abhängt.

Dieselbe Beobachtung läßt sich bei der Zeit-Wirkungsbeziehung machen. Auch hier liegen zwei Zellpopulationen vor, von denen die eine in kurzer Zeit durch ein Zytostatikum vernichtet wird, während eine andere auch bei langer Exposition kaum geschädigt wird. Vincristin scheint eine Ausnahme zu machen; zwar liegt keine lineare Korrelation zwischen Zellschädigung und Einwirkungszeit vor, aber die verlängerte Exposition der Tumorzellen führt zu einer gleichmäßig steigenden Zellvernichtungsrate.

Die Übertragung dieser Folgerungen in die Behandlungsschemata beim Menschen bedarf jedoch noch weiterer Abklärung.

Zusammenfassung

Bleomycin, Methotrexat und Vincristin zeigen gegen das Yoshida-Sarkom eine biphasische Dosis-Wirkungsbeziehung und eine biphasische Zeitwirkungsbeziehung. Das heißt, daß ein Abtöten aller Tumorzellen nicht erreicht werden kann. Die Zytostatikaapplikation als alleinige Therapie der Tumorbehandlung ist daher heute noch keine ausgereifte Lösung. Durch die starken Nebenwirkungen ist es nicht möglich, das Zytostatikum so hoch zu dosieren, um auch die letzte Tumorzelle zu vernichten. Somit ist immer wieder die Gefahr des Rezidivs gegeben. Zytostatika sollten daher als Zusatzbehandlung nach einer Tumoroperation oder nach einer radiologischen Therapie verwendet werden. Ein anderes Indikationsgebiet zur Zytostatika-Gabe sind inoperable und nicht bestrahlbare Tumoren, wobei leider eine Heilung aus heutiger Sicht ausgeschlossen werden kann.

Literaturverzichnis

1. BARRANCO, S. C., HUMPHREY, R. M.: The effects of Bleomycin on survival and cell progression in Chinese hamster cells in vivo. Cancer Res. 31 (1971) 1218

2. BARRANCO, S. C., NOVAK, Judy K., HUMPHREY, R. M.: Response of mammalian cells following treatment with Bleomycin and 1,3-bis (2-chloroethyl)-1-nitrosourea during plateau phase. Cancer Res. 33 (1973) 691

3. BOHANNON, R. A., MILLER, D. G., DIAMOND, H. D.: Vincristine in the treatment of lymphomas and leukemias. Cancer Res. 23 (1963) 613

4. BORSA, J., WHITMORE, G. F.: Cell killing studies on the mode of action of Methotrexate on L-cells in vitro. Cancer Res. 29 (1969) 737

5. BRUCE, W. R., MEEKER, B. E., POWERS, W. E., VALERIOTE, F.A.: Comparsion of the dose- and time-survival curves for normal hematopoietic and lymphoma colony forming cells exposed to Vinblastine, Vincristine, Arabinosylcytosine and Amethopterin. J. Natl. Cancer Inst. 42 (1969) 1015

6. DREWINKO, B., NOVAK, Judy K., BARRANCO, S. C.: The response of human lymphoma cells in vitro to Bleomycin and 1,3-bis (2-chloroethyl)-1-nitrosourea. Cancer Res. 32 (1972) 1206

7. HILL, Bridget T., GOLDIE, J. H., PRICE, L. A.: Studies concerned with overcoming resistance to Methotrexate: A comparsion of the effects of Methotrexate and 2,4-diamino-5-(2', 4'-dichlorophenyl)-6-methylpyrimidine (BW50197) on the colony forming ability of L5178Y cells. Br. J. Cancer 18 (1973) 263

8. HRYNIUK, W. M.: The mechanism of action of Methotrexate in cultured L5178Y Leukemia cells. Cancer Res. 35 (1975) 1085

9. H. MACK Nachfolger: Bleomycinum Mack, Zytostatikum aus der Gruppe der Antibiotika. 2. Auflage (1976)

10. MADOC-JONES, H., MAURO, F.: Interphase action of Vinblastine and Vincristine: Differences in their lethal action through the mitotic cycle of cultured mammalian cells. J. Cell. Physiol. 72 (1968) 185

11. MATSUZAWA, T., ONOZAWA, M., MORITA, K., KAKEHI, M.: Radiosensitization of Bleomycin on lethal effect of mouse cancer cell in vitro. Strahlentherapie 144 5 (1972) 614

12. MAURO, F., BRIGANTI, G., ELLI, R., SCHIAFFINI, G., ZUPI, G.: Plateau phase cultures as a system for studying the effects of Bleomycin in view of its utilization in vivo. Prog. biochem. Pharmacol. 11 (1976) 93

13. MAURO, F., FALPO, B., BRIGANTI, G., ELLI, R., ZUPI, G.: Effects of antineoplastic drugs on plateau-phase cultures of mammalian cells. II Bleomycin and Hydroxyurea. J. natl. Cancer Inst. 52 (1974) 715

14. MIYAKAWA, A., PADARATHSING, M., VADLAMUDI, S., GOLDIN, A.: Effect of combination treatment with Adriamycin and Methotrexate on the survival time of leukemic (L1210) mice. Chemotherapy 19 (1973) 38

15. TAKABE, Y., KATSUMATA, T., WATANABE, M., TERASIMA, T.: Lethal effect of Bleomycin on cultured mouse L cells: Comparsion between frationated and continuous treatment. Gann 63 (1972) 645

16. TERASIMA, T., TAKABE, Y., KATSUMATA, T., WATANABE, M., UMEZAWA, H.: Effect of Bleomycin on mammalian cell survival. J. Natl. Cancer Inst. 49 (1972) 1093

17. TERRASIMA, T., UMEZAWA, H.: Lethal effect of Bleomycin on cultured mammalian cells.J. Antibiot. 23 (1970) 300

Am Schluß meiner Arbeit ist es mir eine angenehme Pflicht, Herrn Priv. Doz. Dr. Dr. Bitter für die freundliche Überlassung des Themas und seine bereitwillige Hilfe bei dessen Bearbeitung meinen herzlichsten Dank auszusprechen.

Lebenslauf

Am 19. März 1950 wurde ich als Tochter des Arztes Dr. Bernd Duchardt und der Zahnärztin Dr. Hilde Duchardt, geborene Gores, in Bad Nauheim geboren.

Von Ostern 1956 bis Ostern 1960 besuchte ich die Volksschule in Bad Nauheim, anschließend bis zu meinem Abitur am 11. Juni 1968 das Gymnasium St. Lioba in Bad Nauheim.

Im Wintersemester 1968/69 und im Sommersemester 1969 studierte ich Physik an der Philipps-Universität in Marburg. Von Oktober 1969 bis September 1971 machte ich eine Zahntechnikerlehre.

Vom Wintersemester 1971/72 studierte ich Zahnmedizin an der Freien Universität Berlin. Dort bestand ich am 3. April 1974 die zahnärztliche Vorprüfung und am 26. Januar 1977 die zahnärztliche Prüfung.

Seit 1. April 1977 bin ich als zahnärztliche Assistentin in einer Praxis tätig.